CRYOBIOLOGY

低温生物学

李广武　郑从义　唐兵/主编

湖南科学技术出版社

A0291881

内容简介

低温生物学是生物学的一门新兴的分支学科，它是研究低温对生物体所产生的影响及其应用的科学。

本书共分五篇13章，从细胞学、遗传学、物理化学和低温工程技术等不同角度全面、系统地阐述了低温生物学基础理论，详细地介绍了各类不同生物材料低温保存的原理与方法，并简要介绍了生物技术发明专利申请与专利培养物的保藏。

本书既可作为科研院所、大专院校从事低温生物学研究及教学工作者的重要参考书，也可作为从事各种生物材料低温保存实际工作者的重要工具书。

低温生物学

主　　编：李广武　郑从义　唐　兵

责任编辑：刘奇琰

出版发行：湖南科学技术出版社

社　　址：长沙市展览馆路66号

印　　刷：湖南省新华印刷三厂

（印装质量问题请直接与本厂联系）

厂　　址：长沙市韶山路158号

邮　　编：410004

经　　销：湖南省新华书店

出版日期：1998年8月第1版第1次

开　　本：850mm×1168mm　1/32

印　　张：11.25

插　　页：4

字　　数：286000

印　　数：1—3100

书　　号：ISBN 7—5357—2048—X/Q·36

定　　价：25.00元

（版权所有·翻印必究）

前　言

低温生物学(cryobiology)是生物科学的一门新兴分支学科，它是研究低温对生物体所产生的影响及其应用的科学。其研究内容包括生物对寒冷环境耐性的机理；生物体冻伤及其防治；生物材料的低温保存和移植等诸多方面。目前，低温生物学在生物耐寒性的理论研究和生物材料冷冻保存的应用研究方面发展较快。低温生物学的研究和应用，不仅促进了生物学、医学等基础学科的发展，而且为农业、畜牧业、医药工业及食品工业等带来了巨大的效益。不仅如此，低温生物学研究广泛、深入地开展，对保护人类赖以生存的环境，挽救濒危的珍稀动、植物及微生物物种，保护生物多样性也将产生深远的影响。因此低温生物学已成为备受人们关注的一门新兴交叉学科。

70年代以来，我国临床低温医学发展较快，并相继出版了《低温医学》、《实用低温医学》、《低温生物医学技术》等专著。这些专著的问世，对推广、普及、提高低温医学和低温生物学起到了重要的促进作用。但我国目前全面、系统介绍低温生物学的书籍甚少。基于这一现状，本书力求全面、系统地从细胞学、遗传学、物理化学和低温工程技术等不同角度论述低温生物学的有关基础理论，并介绍各类不同生物材料低温保存的基本原理和技术方法。本书作者都长期从事低温生物学和生物材料低温保存方面的研究，所撰写的内容参阅了国内外最新资料，并结合了本人长期工作经验和研究成果。

本书由李广武、郑从义、唐兵主编。参加编写的有李广武(第1章)、郑从义(第2章、第8章、第9章、第10章、第12章、第13

章、附录)、唐兵(第 5 章、第 6 章、第 7 章)、万小春(第 1 章、第 2 章)、王林波(第 10 章)、王延枝(第 2 章)、华泽钊(第 3 章、第 4 章)、梁锋(第 11 章)。

本书既可作为科研院所、大专院校从事低温生物学研究及教学工作者的有益参考书,也可作为从事各种生物材料低温保存实际工作者的工具书。

湖南科学技术出版社对本书的出版给予了大力支持;我国在日本京都大学农学院留学的汪光熙博士和在美国芝加哥大学微生物学系留学的卫燕博士为本书提供了大量的文献资料;中国典型培养物保藏中心的全体同志给予多方面的支持;辛晓红同志为全书文稿输入计算机,陈宝联先生为本书绘制插图付出了辛勤的劳动,在此一并致以衷心的谢意。

全书从 1996 年元月组稿,历时 1 年半完成。虽然尽了最大努力,但由于低温生物学发展迅速,内容广阔,涉及多种学科,资料文献浩如烟海,限于编者水平有限,错误之处敬请广大读者和同仁批评指正。

李广武　郑从义

1997 年 7 月于武汉大学

目　录

第1篇　低温生物学概论

第1章　绪　　论

§1.1　低温生物学的定义及其研究范畴 …… (1)
§1.2　低温生物学研究简史 …… (3)
§1.3　低温生物学研究与生物多样性保护 …… (7)

第2章　低温生物学研究的细胞学及遗传学基础 …… (11)
§2.1　植物冻害与抗寒性的细胞学基础 …… (11)
§2.2　微生物冷冻干燥保存的细胞学基础 …… (17)
§2.3　生物材料超低温冻存的细胞学基础 …… (30)
§2.4　低温免疫研究的细胞学基础 …… (33)
§2.5　生物材料低温保存与遗传稳定性的关系 …… (36)

第3章　低温生物学研究的物理化学基础 …… (41)
§3.1　低温保存与低温损伤 …… (41)
§3.2　溶液的冻结特性与细胞的损伤 …… (47)
§3.3　低温保护剂和保存液 …… (57)
§3.4　三元溶液的相图及其在低温生物学中的应用 …… (59)
§3.5　玻璃化保存与溶液的玻璃化 …… (67)

第4章　低温生物学研究的低温工程技术基础 …… (72)

§4.1 低温技术基础……（72）
§4.2 程序降温仪及其应用……（84）
§4.3 低温显微技术……（92）
§4.4 形成玻璃化的超快速冷却方法……（101）
§4.5 低温真空干燥技术……（105）

第2篇 微生物低温生物学

第5章 低温微生物 ……（112）
§5.1 低温微生物的基本概念……（112）
§5.2 低温微生物的分布特点及栖息环境……（114）
§5.3 低温微生物的种类……（123）

第6章 微生物菌种低温保存法概述 ……（127）
§6.1 微生物菌种保藏的基本原理和方法……（127）
§6.2 冷冻保存法……（130）
§6.3 冷冻干燥保存法……（133）
§6.4 菌种保存的质量控制及效果评估……（136）

第7章 各类微生物菌种的低温保存 ……（142）
§7.1 细菌的低温保存……（142）
§7.2 丝状真菌的低温保存……（152）
§7.3 酵母菌的低温保存……（154）
§7.4 藻类及原生动物的低温保存……（155）
§7.5 医学微生物菌种的低温保存……（158）

第3篇 动物材料的低温生物学

第8章 细胞培养物的低温冻存 ……（171）
§8.1 细胞培养物冻存及其质量控制概述……（171）
§8.2 细胞培养物冷冻保存的原理和方法……（176）
§8.3 细胞培养物冻存的实用方法……（180）
§8.4 细胞培养物冷冻保存质量控制范围与检测项目……（188）

第 9 章　细胞培养物冻存前后的特殊检测 …… (210)
§9.1　免疫荧光抗体染色方法 …… (210)
§9.2　同工酶电泳图谱分析法 …… (212)
§9.3　同工酶分析在种内细胞交叉污染检测中的应用 …… (219)
§9.4　染色体分析方法 …… (222)
§9.5　DNA 指纹图谱分析方法 …… (225)
§9.6　PCR 技术 …… (234)

第 10 章　动物胚胎的冻存 …… (238)
§10.1　动物精子的超低温冻存 …… (238)
§10.2　鼠胚的超低温冻存 …… (241)
§10.3　羊胚的超低温冻存 …… (245)
§10.4　水生动物胚的超低温冻存 …… (249)

第 4 篇　植物材料的低温生物学

第 11 章　种质资源低温保存的原理和主要形式 …… (251)
§11.1　种质资源低温保存 …… (251)
§11.2　种质资源低温保存的主要方式 …… (258)
§11.3　作物种质资源低温保存的程序和技术 …… (262)
§11.4　作物种质资源低温保存的发展趋势 …… (282)

第 12 章　植物离体材料冻存概述 …… (289)
§12.1　影响植物离体材料冻存效果的主要因素 …… (291)
§12.2　植物离体材料冻存实用方法 …… (295)
§12.3　植物材料冻存的质量控制方法 …… (300)

第 13 章　植物离体材料冻存实例 …… (306)
§13.1　植物细胞培养物的冻存 …… (306)
§13.2　植物分生组织、芽端的冻存 …… (311)
§13.3　植物花粉、胚的冻存 …… (315)
§13.4　植物离体材料的玻璃化冻存 …… (319)

附　录　专利培养物保藏 …… (325)
Ⅰ. 生物技术发明与专利 …… (326)
Ⅱ. 生物技术发明专利申请与培养物的保存 …… (329)

主要参考文献 …… (342)

第 1 篇　低温生物学概论

第1章　绪　　论

§1.1　低温生物学的定义及其研究范畴

“cryobiology”由“cryo”和“biology”组成，cryo 是一个前缀词，译为“低温”。它源于希腊语，也有冷冻(frost)、寒冷(cold)之意。biology 译为“生物学”，故全词直译为“低温生物学”。起初，“cryobiology”一词主要为美国人使用，英国人一直以“low temperature biology”表达低温生物学的含义。随着时间的推移，各国开始习惯于使用“cryobiology”一词，在较新的文献中，很少用“low temperature biology”。当然，无论以哪种形式表达，二者的意思是一样的，均强调低温与生物学的关系。

尽管“低温”是一个经常被使用的词，但就其定义而言，可以说是非常含糊的。例如，物理学上所指的低温，是指接近于绝对零度的极低温度(－273℃)；而农业上所说的低温(冷害)，常常是指那些比常温稍低一点的温度而言；微生物学上的低温冷休克(cold shock)温度通常为 + 4℃ 以下；医学上常提到的体温过低(hypothermia)泛指低于人体温度(37℃)的体温；食品保鲜学上的低温冷冻(chilling)意为食品的冻结温度(－20℃)以下。可见在日常

生活中，很难给低温一个确切的定义。那么，低温生物学要讨论的低温到底是一个怎样的温度范围呢？从“低”这方面来说，实验中可以实现的低温可达到绝对零度，即－273℃；而从“高”这方面讲，若以温度划线，似乎是一个难题。然而，从低温生物学研究性质、研究对象划线，上限温度可以放在0℃附近，或者是更高一些(5～10℃)。这样的温度范围足以概括低温生物学的研究范畴。

在低温生物学中，还有一个对低温形式的语言表达问题，如低温、极低温、超低温所表达的温度范围差异很大，如果说极低温度是指接近绝对零度(－273℃)，那么，超低温的概念则使人感到茫然。因此，习惯上，将液氮温度(－196℃)称为超低温；干冰温度(－70℃)称为极低温；低温则从4℃往下线推。急速冻结、缓慢冻结一类的词也常在低温生物学中被使用，严格地讲这也是不妥的，因为二者间并无一个冻结的温度和速度概念。Smith提出的语言表达方式(表1－1)比较好地解决了温度和速度间的关系，尽管有学者持不同意见，但仍有其参考价值。

表1－1　　Smith提出冷却温度与速度的语言表达

温度范围	冻结时间	语言表达
0～－190℃	2秒以内	超速冻结(ultrarapid)
0～－79℃	2秒～5分钟	快速冻结(rapid)
0～－79℃	16分钟以上	慢速冻结(slow)
－20℃及其它	1小时以上	极慢速冻结(very slow)

以上讨论的是低温的定义和语言表达等问题。鉴于低温生物学是以生物活体为研究对象，所以有必要对低温与生物活体机能间的关系进行讨论。在低温生物学研究中，如果以生物体的死活为基准，那么生物体间对低温的抗性(或耐受性)差异显著。一般认为，最高级的动物——人对低温的耐受性是最弱的，而最低级的生物体——微生物则是最强的。例如，在比37℃高或者低10～20℃的情况下，人的生命就有危险。而多数细菌、病毒在近于绝对零度，即－273℃的最低限温度条件下，仍能生存。这可以说是两

个极端，几乎所有生物的生存温度均位于这两个极端之间。当然，有时同种生物体间对低温的抵抗力也存在差异。诸如单细胞微生物的低温抗性差异还与培养条件、生理状况、遗传特性有直接的关系。所以低温生物学研究的目的之一就是要比较、确定其温度差异，从而有效地保存它们。

综上所述，低温生物学可以定义为是研究低温条件下生命现象的科学。其研究内容涉及动物学、植物学、微生物学、医学、农学、林学、食品科学中的许多方面。它以物理学、化学、低温工程学为依托，以生物化学、生物物理学、细胞生物学、遗传学为基础，研究生物个体的低温生存环境、离体生物材料的低温保存、植物的冻害及耐寒性，探索低温损伤机理，发掘低温抗冻物质，实施冷冻医疗等，从而阐明低温条件下生命现象的特征及其本质。

§1.2 低温生物学研究简史

低温生物学产生的确切年代虽然不太清楚，但可引用 Dr. Luyet 在 Society for Cryobiology 的创立大会上的演讲内容，对低温生物学研究历史作简要介绍。

人类自原始时代就开始不断地与寒冷作斗争。例如，用火取暖、剥取动物皮裹身等等。但是，冰期过后，随着地球上气候的逐渐变暖，防范高温的问题又接踵而来，于是，人类又开始考虑利用寒冷。例如，在冬季，将冰准备好供夏季保存食品用。这些与生活密切相关的问题促进人类考虑利用低温，使人类的智慧得以发展。在悠久的人类历史中，能作为低温生物学的基础，针对寒冷对生物体影响的研究始于 18 世纪。在当时，多以植物为研究对象，具体的研究内容包括冻结的障碍作用、产生障碍的原因及冰侵入植物的机制的观察；对冻结抵抗力强的植物和抵抗力弱的植物的差异研究；耐冻性因子的探索；冻结障碍的防范以及使动植物耐冻的方法等等。

另一方面，关于寒冷对动物的影响的研究，首先被作为问题提

出的是昆虫和水生动物是怎样忍受冬季的寒冷以及水的冻结。另外，也弄清了线虫类的小动物即使在干燥状态下也能够长期生存，以及植物的种子等不仅能够忍受干燥，而且以脱水来增加对低温的抵抗性等事实。进入19世纪后，随着多种微生物的发现，知道了微生物也对冻结和干燥有很强的抵抗性，特别是芽孢的抵抗性非常强。

就温度而言，作为影响生物生存的外部因子，不仅有自然的气候条件，而且还能够人为地创造寒冷环境。制冰法、空冷冷冻机、空气液化机分别于1834年、1849年、1895年被研制成功。这些获取低温的方法和装置的开发及利用，使低温生物学的实验研究变得相对容易，促使该领域的研究得以快速发展。

进入本世纪后，随着应用范围的不断扩大，低温生物学得到了快速的发展，尤其是30年代以来的数十年的进步格外迅速。Luyet(美国)、Levitt(美国)以及Greaves(英国)等的研究大体上就是在这个时代。第二次世界大战后，应用方面的发展引人注目，其被广泛地应用到制药及食品加工等领域就是其特征之一。另一方面，其在医疗领域的应用，例如低体温法、患部冻结法、移植用材料的保存法等外科领域广泛使用的方法都是近几十年的事，是低温生物学的新领域。

如果进一步将整个历史过程归纳一下，可以将其分成以下两大部分。

第一部分是关于生物在自然气候条件下对寒冷的感受性或抵抗性的观察。这也是与人的冻死及冻伤有关联的问题。简言之，即低温会给生命体带来什么影响？或者说，生命体是怎样忍受低温的？这些是自古以来就存在，但至今仍留有许多未知点的低温生物学的重大课题。

第二部分是以这些自然现象为基础，在实际应用中发展起来的问题。在多数情况下，主要是针对生物体的保存，利用冷冻机或致冷剂来冷却以达到极低的温度。保存温度越低，生物体代谢机能越低下，就越能够抑制活性物质的作用，所以，液态氮常常被用

来保存实验材料(如生命体的细胞或组织)。但生物材料在冷冻和复原过程中常常会承受种种损伤。因此,为了尽可能地减少其损伤,保护物质的研究曾一度盛行,自 1949 年 Polge 等添加甘油低温保存动物精子获得成功以来,人们为低温保护物质的筛选、应用花费了许多精力。迄今 DMSO、PVP、乙二醇等低温保护剂广泛被应用。

应该说,低温生物学发展最快是近二十几年的事,进入 80 年代以来,由于热物理学、物理学、化学、工程学和生物学、医学等学科的渗透、交叉,低温工程理论及实用设计原理的不断更新及应用,低温生物学的研究快速发展,取得许多突破性的进展。诸如高精度程控降温仪、低温显微镜、微热电偶测温计的问世,使得研究生物材料冻存的降温速率、测定冰晶形成方式、诱导冰核形成等更为方便,人们可以在 +30～ −180℃ 范围内任意调整变温,根据冻存材料的种类和状况,调节降温速率。现已证明,不同的单细胞个体,同一种细胞或组织,在相同的低温保护剂中,以不同的速率降温冻存、复温后,活性相差甚远。但人们通过借助高精度低温研究仪器,控制降温条件,可以取得明显的冻存效果。目前,各种生物材料单细胞长期冻存成为可能,并能对包括动物器官(胰腺、皮肤、角膜、眼球等)、植物组织(花粉、胚、叶片等)进行冻存。另外,玻璃化冻存技术已从研究向应用发展,各种玻璃化保护剂配比设计、保护剂种类的选择、浓度的调整、加入方法和去除方法都在不断完善,并趋于标准化。基础研究为实际应用奠定了基础,使得多种生物材料已能成功地玻璃化冻存。应该说,这一技术具有广阔的应用前景。

最近几年,抗冻蛋白的分离、纯化,抗冻基因的发现,使低温生物学的研究从个体、细胞水平进入分子水平。现已证明,抗冻蛋白不但能作为一种抗冻剂用于细胞或组织的低温冻存,还可采用基因重组、转移的分子生物学技术,将抗冻基因进行转移,从而选育抗冻动物(鱼类)、抗冻植物。虽然这些研究还处于起步或初步研究阶段,但发展很快,受到低温生物学家、遗传学家的高度重视。

例如，大西洋的大马哈鱼不具备抗冻能力，因此，不能在寒冷的北大西洋养殖。将抗冻蛋白基因导入大马哈鱼体内，并使其表达抗冻蛋白，从而增强抗寒能力，并能在北大西洋养殖。

低温免疫的研究取得突破性进展，冷冻免疫已不再是仅限于冷冻治疗肿瘤的观察。90 年代以来，已发现器官冷冻后，对降低免疫排斥反应有明显的作用；人外周血单核细胞冷冻后，可增强分泌多种细胞因子的功能。这些发现具有重要价值，开辟了低温生物学研究的新领域。

另外，低温对生物体的损伤机理、生物体抗冻性方面的研究已进入亚细胞水平、分子水平。通过对多种生物材料的研究，很多假说得到实验的证实，如膜损伤学说、DNA 修复机制、酶偶联形式等。这些研究不仅阐明了很多理论问题，也为低温医疗、冷冻保藏的普及提供了理论依据。

如前所述，低温生物学自形成体系以来，历史还很短，尽管如此，其应用范围日益扩大，至今这个边缘科学所研究的内容已涉及到很多方面，而且使人感觉到有许多基础性问题尚未阐明，而应用方面却先行了。例如，冻结及干燥所引起的细胞障碍的机制尽管还不清楚，但为防除障碍用的保护物质的利用却已积累了许多的经验。另外，同样是基础研究，但生物的个体水平和细胞水平之间以及细胞水平和构成细胞的蛋白质、脂类等的分子水平之间的研究，还存在着很大的鸿沟。因此，还需各个领域研究者通力合作，共同攻关。可以相信，蛋白变性的研究直接用来说明细胞损伤机制的日子会早日到来。

另一方面，应用领域在今后还有可能更大地扩展范围。例如，低温生物学现在已经在宇宙生物学方面发挥着重要作用；在医学领域，从移植用脏器的保存到生物体自身的冻结保存，都是学者们不断研究的重要课题。今天的梦想有很多会变成明天的现实，我们期待着低温生物学研究的飞跃发展。

§1.3 低温生物学研究与生物多样性保护

一、生物多样性保护的意义

生物资源是地球上生命存在的基础，其中也包括人类自身生存的基础。因此，保护生物资源就是保护人类赖以生存的基础。但是随着科学的进步、工农业的发展、人口的膨胀，人类正在不知不觉地破坏赖以生存的环境，生物多样性正在以前所未有的速度遭受破坏。最新的估计认为，在过去的2亿年中，平均每100万年有90万种脊椎动物灭绝。根据Myers(1988)的粗略估计，大约每27年就有一种高等植物灭绝，这个速度还在不断加快。根据全球2000年预测报告，如果人类的消费水平和破坏状况按目前情况不变，预计到2000年，地球上全部物种的15%～20%将会消失。最近一个关于世界鸟类的综合评价总结说，在9000种世界鸟类中，有1000种(占11%)不同程度地受到灭绝的威胁，而1978年才只有290种鸟类受到威胁。在我国，生物多样性也同样面临着严重问题，由于人口压力，需要更多的耕地及生活和生产资料，大面积森林遭受砍伐，草原开垦和过度放牧，致使我国十分丰富的生物多样性走向被破坏的境地。有人估计，我国目前至少有3000种植物处于濒危，有3万～15万种生物受到严重威胁，如不采取有力保护措施，很快就要绝灭。世界各国对生物多样性保护十分关注，在1980年世界自然资源保护联盟(IUCN)、联合国环境署(VNEP)和世界野生生物基金会(WWF)联合提出的《世界自然保护策略》就指出要维护基本生态学过程和生命维持系统，保护基因多样性、物种和生态系统的永续利用，对生物多样性的三个方面已明确指出要加以保护。在80年代初，IUCN进一步提出了“抢救植物就是拯救人类”的行动纲领，说明了生物多样性与人类生存的密切关系，所以生物多样性的保护，决不是一个小问题，而是关系到人类生存的大问题，否则将对子孙后代犯下无法弥补的错误。

二、生物多样性保护的内容

生物多样性是指地球上所有的生命资源，是40亿年来自然进化的结果，它包括几万甚至上千万的植物、动物、微生物以及它们所拥有的基因，以及由这些生物所构成的生态系统。因此，生物多样性包括三方面的内容，即生态系统多样性、物种多样性和遗传多样性。

（一）生态系统多样性

生态系统是指在一定空间下，植物、动物、微生物及其所在地的环境因素，通过能量流动和物质循环而发生相互作用的综合体。我国地域辽阔，地处寒温带、温带、暖温带、亚热带和热带，从东南沿海到西北内陆，又有湿润、非湿润、非干旱和干旱不同的地区，加之我国地形复杂而增加了我国的复杂性。据初步统计，我国森林就有16个大类，约185类生态系统，还有4大类草原、7大类荒漠以及高山植被等约460类生态系统。这样规模的生态系统的多样性是我国的一项宝贵财富。

（二）物种多样性

物种是生命存在的基本形式，也是生态系统中生物群落组成的基本单元。因此群落的物种多样性是生态系统结构和功能的决定因素。可是直到如今，人们还不能精确估计全球物种的数量，不同的研究者估计数差距甚大。据估计，地球上所存在的生物约为500万～3000万种之间，经科学家订名的种类只有140万种，其中昆虫约75万种，脊椎动物4.1万种，植物（主要为维管植物和苔藓植物）为25万种，真菌10万种，其他还有无脊椎动物、藻类及微生物等。我国也是物种极其丰富的国家之一，仅就动物而言，昆虫为15万种，无脊椎动物3.5万种，脊椎动物已知5139种（兽类499种，鸟类1186种，爬行类380种，两栖类270种，鱼类2804种）。我国动物种类数约占全世界动物种类的十分之一左右，说明我国是一个物种多样性极为丰富的国家。

（三）遗传多样性

每一物种都是一个独特的基因库。可以说物种多样性中包括遗传多样性，但遗传多样性远远超过物种多样性的范围。种下可

能有亚种的分化，或由许多地理或生态种群所组成，家养动物包含有众多的品种和类型。因此，许多物种实际上包含成百上千个不同的遗传类型。例如，泥鳅的同一亚种 *Cobitis taenia taenia* 中存在 2n＝50，75，86，94 等 4 种染色体数目，显示了丰富的遗传多样性。遗传多样性是生命进化和适应的基础，种内遗传多样性愈丰富，物种对环境变化的适应能力愈大。因此，保护遗传多样性有利于物种的生存。

三、低温生物学与保护生物多样性的关系

由于低温能抑制生物体的生化变化，而且低温生物学的研究促进了生物低温保存技术的不断提高，使低温保存生物材料在医、农、牧的实践中得到广泛应用。如在医学方面，低温能保存血液及某些组分、精子、胚胎、骨髓细胞、肝细胞、皮肤、角膜、胰腺组织等，为临床医学带来了突破性的发展。在农业方面，世界各国建立了作物种质资源冷库，保存栽培、野生及人工创制的谷类、豆类、薯类、油类、糖类、纤维类、蔬菜类、果树、森木、花卉等品种或系。随着生物技术的迅速发展，种质资源的保存范围在不断扩大，包括组织培养物如单细胞、原生质体、花粉、种子胚、愈伤组织等。近 10 年来，我国在超低温保存植物花粉研究方面，解决了许多关键技术，取得了很大成功，如玉米、黑麦、桃和梨的花粉保存 2 年后，用于授粉，田间结实率为 77.8%、60.7%、53.8%、92.3%，相当于对照的 91.4%、79.0%、94.6%、96.3%。武汉大学中国典型培养物保藏中心在保存光敏核不育水稻愈伤组织和油菜花粉研究方面也获得较好的结果，这对于解决花期不遇、异地杂交及为育种工作提供了方便。在畜牧业方面，哺乳动物精子和胚胎的低温保存，通过“借腹怀胎”的办法得到大量的良种牛崽，为畜牧业带来了巨大变革。这一保存方法对挽救濒危的珍稀动物如大熊猫、东北虎等有重要的意义。我国成功地实现了熊猫精子的种子库保存，不让其变异。液氮低温种子库有其特殊的优点，不会有病害和虫害，能长期保存而无变异，不需要复杂的温度和湿度调节等。不难看出，开展低温生物学的研究，有利于生物多样性保护技术的不断提高，使

生物资源得到更有效的保护，特别是对挽救那些处于濒危的珍稀生物资源有着更为特殊的作用。反过来，得到保护的生物资源又可以丰富低温生物学研究的内容和范围，使生物多样性保护与低温生物学研究得到协调发展。

第2章　低温生物学研究的细胞学及遗传学基础

细胞是生物体结构和功能的基本单位。生物体的生命活动在细胞内进行，而且对环境条件有直接的依赖关系。通常，任何环境因素的变化，将会不同程度地对细胞的生命活动造成直接或间接的影响。在低温生物学研究中，低温作为一种外部因素，可直接影响细胞的生命活动，使细胞产生一系列形态、生理、生化和免疫学功能的变化。同时，低温也可以作为一种保护源，用于生物细胞的长期保存。因此，深入了解细胞的基本结构与功能，对于研究细胞的抗冻机理、低温损伤机制，有效地利用低温生物学技术极为重要。本章在介绍细胞结构与功能的基础上，重点讨论低温在细胞水平、亚细胞水平、分子水平可能产生的效应，为后面各章节阐述各种生物材料的低温生物学问题提供理论依据。

§2.1　植物冻害与抗寒性的细胞学基础

低温冻害严重危害许多植物生存，尤其对粮食作物、果树、蔬菜及经济作物的影响更为突出。克服低温冻害是科学家，特别是低温生物学家研究的重要任务之一。鉴于植物的生命活动都是以细胞为基础的，因此，从细胞学着手研究植物的冻害及抗冻害机理，将为探讨植物冻害发生机制和深入开展抗寒性的应用研究提供细胞学依据。

一、植物微管的低温稳定性与其抗寒性的关系

微管是细胞骨架中起主要作用的成分，同时是细胞骨架中最活动的结构。早期曾认为，温度是影响微管聚合状态最敏感的一个因素，无论在体内或体外，0～4℃低温可使微管解聚。因而有人

将微管装配的温度动力学性质用公式列出：

$$\text{二聚体亚单位微管蛋白} \underset{0\sim4℃}{\overset{25\sim37℃}{\rightleftharpoons}} \text{多聚体微管}$$

这一公式已成为微管蛋白分离纯化技术中的重要理论指导和关键步骤。然而，近年来研究发现，这一公式并不适合于所有微管的动态。在高等植物中，Nelmes 曾发现，苹果茎组织在 4℃低温固定后，仍然可在超薄切片中观察到大量的微管。我国植物抗寒性细胞学研究的先驱——简令成教授则获得了更直接的证据，他采用间接免疫荧光的细胞化学技术，对番茄、黄瓜、菠菜、甜菜及小麦等不同抗寒性植物微管的低温稳定性进行了比较研究，结果发现，不抗寒的喜温性植物番茄和黄瓜的气孔保卫细胞的微管在 0～1℃低温下处理 3 小时即解聚；属于中等抗寒性植物的菠菜和甜菜幼苗经秋季低温适应后，其气孔保卫细胞的微管在 0～5℃低温处理 3 小时，均不发生解聚；具有较强抗寒性的冬小麦品种农大 139 幼苗在 2～3℃低温处理期间，微管结构保持完整；于此温度条件下处理 15 天的幼苗，用 －8℃的低温冷冻处理 3 小时，微管也不受破坏。简教授的研究结果表明，微管的低温稳定性与植物的抗寒性呈正相关。此研究结果不仅对植物微管温度的生物物理特性提供了一个比较全面的实验证据，而且对植物抗寒机理的探讨提供了新的理论依据。

大量的研究结果表明，质膜是低温对植物损伤的最初部位，而周质微管与质膜之间有“桥”相连接，微管—桥—质膜三者之间的连结形成一个稳定的体系。很显然，微管的形成和破坏，必然会影响质膜的稳定性。另一方面，激素在植物抗寒基因表达和抗寒力提高中的作用已被证实，而微管起着输送激素的作用。因此，微管还可以通过影响激素的运输来影响植物的抗寒力。由此看来，植物微管的低温稳定性与其抗寒性有密切的关系。

Burch 等观察到，一种无壁锥形的南极藻（*Pyramimonas gelidicola*）的微管能抵抗 －14℃的低温。但是非抗寒农作物在遭受 －5℃左右的冻害后，叶片细胞的微管就被破坏，引起微管蛋白多

聚体的不可逆解体。通过抗寒适应处理，可改变微管对低温的敏感性，提高其稳定性。不同的研究结果证明，微管多聚体蛋白对温度的稳定或与植物对环境的适应性有关，为种的特性，但温度处理能不同程度地改变这种稳定性。因此，研究植物微管的低温稳定性对阐明其抗寒机理开辟了新的研究途径。

二、植物细胞表面糖蛋白与其抗寒性的关系

Luft(1971)采用钌红(ruthenium red)染色并制备电镜样品，首次用细胞化学的方法观察到动物细胞表面存在一层清晰的糖蛋白结构。以后进一步证明，动物细胞表面的糖蛋白具有细胞识别、抗原特异性、过滤作用、调控微环境以及充当酶作用等多种重要的生理功能。后来发现，植物细胞表面也存在着糖蛋白层，其厚度在50～100nm间，并证实它与多种细胞识别现象有关，例如，藻类雌雄配子体之间的识别与结合；高等植物花粉和柱头的识别；根瘤菌和豆科植物根细胞共生关系的建立；植物与病原菌之间的识别与抗病性等。80年代中期，简令成等研究发现，植物细胞表面糖蛋白的存在与否、糖蛋白层的厚薄与其抗寒性相关。抗寒植物细胞表面的糖蛋白层还可通过低温处理而加厚，这种糖蛋白层的加厚，使植物的抗寒性也增强。显然，细胞表面糖蛋白层的存在，就像人们在冬季寒冷时添加棉袄一样，增加了细胞的抗寒能力，这是抗寒植物细胞的一种自我保护功能。

三、低温冻害对植物细胞质膜及细胞器结构与功能的影响

低温环境是影响植物生命活动的主要外界因素之一，环境温度的变化会不同程度地引起生物体代谢的变化，导致生物体生理性衰老、死亡。虽然有些植物体内有一个适应调节机制，从而能在较大的温度范围内正常生长。但多数植物则不能，低温会给这类植物造成冻害，使其细胞结构、生理、生化功能产生一系列变化。一般认为，冻害对植物细胞的影响以质膜、细胞器、细胞骨架组分的异常、功能的破坏最为多见。对这些细胞重要结构和功能的冻害损伤机制的研究，以质膜和细胞器方面尤其活跃，并在结构与功能的统一上取得较大突破。

（一）冻害对植物细胞质膜损伤作用

植物细胞的质膜与其他生物体细胞质膜一样，在维持稳定的细胞内环境、控制细胞内外物质交换、接受外来刺激和信号、调节细胞的生命活动、甚至参与细胞间的相互识别等方面都起关键性作用。严格地说，细胞型生物体的细胞可以没有细胞壁（如动物细胞），但绝对不能没有质膜，一旦质膜严重受损，细胞必然死亡。现已证明，低温对细胞的损伤一般从质膜开始，因此，质膜是研究抗冻机制、耐寒机理的理想材料。

冻害发生在自然条件下，其严重程度与季节变化、温差大小、持续时间、植物本身的耐寒性有关。通常冻害对植物细胞质膜的损伤程度有以下几种情况：

（1）致死性损伤　冻害严重，持续时间长，温差大，造成植物细胞质膜严重破裂损伤，不能维持正常的生理功能。由此引起细胞死亡，组织坏死，叶片枯竭。

（2）非致死性损伤　冻害对植物细胞的质膜造成一定程度的损伤，局部改变了膜的透性，这种情况不会造成细胞的致死。冻害解除后，膜有一个自身的修复过程，经过一定时期的恢复生长，细胞质膜又能正常行使生理功能。

（3）影响膜的流动性　生物膜的流动性是膜结构的一个基本特征，在生理条件下，生物膜都具有其合适的流动性以体现正常功能。在体内外因素的影响下，机体具有一定的调节机制以维持其合适的流动性，如果这些因素的影响超越其调节范围，就会使膜的流动性变得异常。冻害对植物细胞质膜的影响是改变其脂质分子结构，使质膜流动性发生相变，即从流动的液晶态转为凝胶态，这样细胞的生理功能不能正常表现而导致损伤。因此，杨福愉等认为，膜脂流动性是反应植物抗寒性的理想指标。通常，植物的抗寒程度与其脂膜流动性呈正相关，抗寒程度越弱，膜的流动性越小。

（二）冻害对植物细胞线粒体结构功能的影响

线粒体是植物细胞内重要的细胞器，有细胞动力泵之称。植物细胞内的线粒体对环境因素敏感，容易受环境因素的影响而改

变其生理功能。冻害对植物细胞线粒体的影响是多方面的，轻者影响能量代谢，重者造成膜结构损伤。归纳起来，冻害对线粒体的损害可能发生在以下几个方面：

（1）影响线粒体超细微结构的变化　非耐寒植物细胞经低温处理后，可观察到细胞内的线粒体明显膨胀，外形增大；内部嵴的长度变短，而且也呈膨胀状态，嵴分布稀疏；线粒体内基质致密度减少并趋于透明。而耐寒植物在同样条件下处理，其细胞内线粒体的超细微结构没有出现明显变化。

（2）影响线粒体的生理功能　经4℃低温处理后，从不耐寒植物细胞分离出线粒体，测定其耗氧量、呼吸控制和氧化磷酸化效率，结果发现，受低温处理的影响，线粒体的呼吸控制率、氧化磷酸化效率均大幅度下降，而耗氧量却明显增加。这说明低温处理对线粒体的生理功能影响显著。

（3）影响细胞中 ATP 的含量　线粒体是植物细胞能量代谢的重要场所。正常情况下，细胞经过同化作用，分解吸收营养物为己所用，分解过程产生的能量以 ATP 的形式贮存起来，故细胞中 ATP 的含量可反映分解代谢的水平。对于高等生物而言，细胞中 ATP 的含量还反映线粒体的生理功能水平，如果 ATP 含量下降，则证明线粒体的能量转换功能受阻。已发现，经低温处理的非耐寒植物细胞，ATP 的含量显著下降，而耐寒植物细胞中的 ATP 含量则与对照差别不大。这证明冻害对细胞线粒体的损伤是不可置疑的。

（三）冻害对植物细胞叶绿体结构和功能的影响

（1）低温寒冷对叶绿体光合作用的影响　过去认为冻害引起水稻减产主要是由于开花期受低温寒冷的影响，使水稻授精过程不能正常进行，造成大量颖花不育，结实率骤减所致。后来的研究则证明，寒冷引起水稻减产主要是影响叶绿体的光合作用。Kelly 等经过系统的研究，提出了低温影响叶绿体光合作用的可能机制，即低温对光合作用的关键酶 FBP 酶的活性影响显著。而 FBP 酶是绿色植物 Calvin 循环调节作用的关键酶，它对光合作用的运转

和光合作用产物转化及运输起着控制作用。FBP 酶一方面参与糖类合成，另一方面参与 CO_2 受体二磷酸核酮糖的再生，使光合作用不断地运转。低温引起 FBP 酶活性下降，光合作用减慢，致使结实率降低。Kelly 的推论已被 Fondy、Still 等的研究结果所证实。可见低温对叶绿体光合作用的影响是存在的，但这种对光合作用的影响可由温度回升有所恢复。

(2) 冻害对叶绿体结构的影响　叶绿体作为绿色植物细胞中的一种重要细胞器，是光合作用的重要场所。除 FBP 酶外，还有多种酶参加作用，它们相互协调，充分发挥自身的作用，这种功能的统一与叶绿体结构的完整是分不开的。冻害造成对叶绿体结构的损伤，使光合作用无法进行。叶绿体结构的损伤是不可逆的，尤其是脂膜结构破坏，将使叶绿体完全丧失其功能。德国生物学家 Heber 报道，菠菜分离的叶绿体经 -20℃ 冻存后，叶绿体膜结构遭到严重破坏，完全丧失了光合作用的功能。因此，冻害比寒冷对绿色植物光合作用的威胁更大。

(四) 低温对植物细胞内 Ca^{2+} 分布的影响

Ca^{2+} 是调节多种细胞功能的一种细胞内第二信使，起着与环腺苷酸(cAMP)相类似的作用。它作为细胞内信使触发许多重要的细胞活动，与 cAMP 共同行使信息传递作用，从而影响植物的生长发育，以及对外界环境的反应与适应。正常生理状况下，植物细胞质和细胞核中的游离 Ca^{2+} 水平非常低，而液泡中 Ca^{2+} 的浓度很高，被称为植物细胞的 Ca^{2+} 库。在 0～1.0℃ 的低温条件下处理水稻幼芽组织，电镜制片观察发现，水稻细胞的胞质中 Ca^{2+} 的浓度显著增多，而常温下培养的对照细胞质中 Ca^{2+} 浓度极低。现已发现，多种非耐寒植物受冷害后，细胞质内的 Ca^{2+} 也明显增加。这说明低温对细胞内 Ca^{2+} 的传递和分布有一定的影响。值得注意的是，Ca^{2+} 的分布改变将影响植物细胞中的正常生理功能，细胞质内 Ca^{2+} 水平的提高，可以诱发多种反应过程，如通过活化 CaM 进而激活依赖于 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} - CaM 的蛋白激酶的磷酸脂酶，从而一方面引起膜蛋白和周质骨架蛋白的磷酸化，另一方面引

起膜脂的降解，结果造成细胞骨架和膜结构的破坏。膜结构的变化会使膜的透性发生改变，并同时改变膜束缚酶的活性，进而放大或逆转有关的生化反应过程，最终导致细胞内物质代谢的不平衡。此外，细胞质内 Ca^{2+} 水平增加还会与细胞质中磷酸根发生沉淀反应，扰乱以无机磷为基础的能量代谢系统。显然，低温促使 Ca^{2+} 的分布改变，通过 Ca^{2+} 诱发一系列的代谢改变，致使植物细胞发生损害，这种损害作用在冻害的早期似乎并不显著，故往往被忽视，应引起重视。

§2.2 微生物冷冻干燥保存的细胞学基础

冷冻干燥（简称冻干）是制备和保存生物材料的极佳方法，它融冷冻和干燥技术特点为一体，使众多的生化产品、菌苗、疫苗、微生物菌种能用此法直接冻干后长期保存。目前，冷冻干燥技术已广泛应用于制药工业、医疗卫生、生物制品、微生物菌种保藏等领域的研究及生产中，具有广阔的应用前景。冷冻干燥技术之所以广泛应用，应归于它自身的技术优势。冷冻干燥至少有五个重要的技术优点：①能保证冻干材料基本特性的稳定；②能使冻干微生物菌种的新陈代谢基本停止，使其处于休眠状态；③能获得易于复水的粉状固形物；④能有效除去冻干材料中的多余溶剂；⑤能浓缩体积过大的生物材料，使其体积减少，便于贮存。显而易见，非细胞形状的生化产品或化学制剂的冷冻干燥，足以使冻干材料获得预期的效果。但是，对于活细胞材料，如微生物菌种、菌苗的冷冻干燥而言，除充分利用冷冻干燥的技术优点外，不能不考虑细胞本身的基本特性，因为微生物菌种的冻干效果是以冻干后细胞的存活性及特性的稳定程度作为评估指标的。如果冷冻干燥过程造成细胞的损伤致使冻干后的细胞活性极低，甚至基本特性丢失的话，无任何贮存价值，失去了冻干的意义。所以，微生物的冷冻干燥保存建立在牢固的细胞学基础之上，微生物细胞的结构特点、生存环境及其生理状态是冷冻干燥获得成功的保证。况且冻干对微生物

的损伤，通常也发生在细胞水平、亚细胞水平、分子水平上，无牢固的细胞学基础，研究微生物冻干损伤机理很难深入。这就是本节介绍微生物冷冻干燥保存细胞学基础的目的所在。

一、微生物细胞结构与功能的统一有利于冷冻干燥保存

微生物体积微小，结构简单，生物学特性比较接近，尤其是结构与功能具有相对的统一性，为微生物的冷冻干燥保存提供了极为有利的条件。冷冻干燥适用于大多数细菌、放线菌、病毒、霉菌、酵母等微生物的保存，而对于高等真菌的营养体冻干极为困难。一般来说，冷冻干燥效果好的微生物多为单细胞，因为像细菌一类的单细胞微生物，结构简单，生长周期短，对环境的适应性强，容易获得大量的健壮细胞，且易于分散，有利于冻干保存。当然，更为重要的是，单细胞微生物的结构与功能是相对统一的，生命活动周期以单细胞为唯一体现形式，细胞的功能可以在一个细胞内表现得淋漓尽致，细胞结构的改变直接影响功能的发挥，细胞功能的丧失又导致细胞结构的裂解，二者间相辅相成，具有相对的统一。

微生物具有自身的结构特征，尤其是原核微生物——细菌，其结构可分为两部分：一是稳定的基本结构，如细胞壁、细胞膜、细胞核和核糖体，为细菌细胞所共有；二是可变部分或特殊结构，如鞭毛、散毛、荚膜、芽孢和气泡等，这些结构只在部分细菌中发现，具有某些特定功能。无论是稳定的细胞结构还是特殊的细胞结构，其功能的表现都是由单个细胞控制的，并围绕单细胞的生命活动进行。例如坚硬的细胞壁结构，它不但具有保护细胞免受机械性损伤或渗透压的破坏，维持细胞外形的功能，还是很多细菌表面糖蛋白、脂蛋白存在的支撑物，也是细菌鞭毛运动所必需的。更重要的是，细菌细胞壁的存在，对于细胞承受冷冻和干燥的激烈条件是必不可少的，无细胞壁结构的动物细胞，或细菌去掉细胞壁的原生质体是不能冷冻干燥的。另外，细菌的某些特殊结构，如质粒、芽孢、鞭毛、荚膜等，它们的存在使细菌赋于某种特征，可以决定其耐药性、耐干燥程度、运动性、致病性等。通常细菌的某种特殊结构丧失，只能影响某种功能的改变，而不能使细菌的生命活动停止。

再者，细菌的结构简单，生长周期短，对环境的适应性强，某些非致死性的生理性损伤，可以在短期内修复，不至于影响细菌的其他生命活动。如果说细菌适应于冷冻干燥保存是其结构和功能相对统一的结果，那么某些酵母菌、丝状真菌、乃至高等真菌则有些例外，适于冻干保存的真菌一般都能长孢子，且孢子是冻干保存的极好材料。非孢子营养体的冻干保存效果不佳，即便是单细胞的酵母菌冻干效果也远不如细菌好。多细胞的高等真菌生活周期较为复杂，甚至存在有性繁殖和无性繁殖的差别，使冻干样品的制备要求更高；冻后恢复生长的条件变得更为苛刻；某些损伤修复几乎不可能进行。因此，无论是细菌还是其他微生物，成功地进行冷冻干燥保藏与结构和功能的统一是分不开的。

二、保护剂系统对微生物冻干保护效应

影响微生物冻干效果的因素涉及方方面面，诸如微生物的生理状态、细胞浓度、pH 值、保护剂系统、预冻温度、降温速率、冷冻干燥条件、细胞含水量等都不同程度地影响冻干效果。相比之下，保护剂系统对微生物冻干效果的影响更为突出，这已被国内外众多的研究报道所证实。所以，几乎所有微生物细胞的冻干，都添加保护剂系统。那么，在冻干过程中，保护剂对微生物细胞到底起到何种保护作用呢？这是微生物学家、低温生物学家都一直关注的问题，近年的研究，取得一些突破性的进展。

（一）避免微生物细胞因脱水造成的危害

冷冻干燥是冷冻和干燥技术的有机结合。微生物细胞在冻干过程中要经受冷冻和干燥两种激烈因素的作用，损伤是不可避免的。同时，微生物冷冻干燥实际上就是细胞脱水浓缩，除去细胞内过多水分的过程。虽然自然界中存在很多耐低温、耐干燥的生物体，如细菌芽孢、真菌孢子、酵母细胞等，它们可在自然冷冻或干燥环境中使细胞脱水，使细胞中的水分维持极低的水平，并在干燥环境中生存几年，甚至十几年。但自然状态下细胞的冷冻或干燥脱水，对于多数生物体细胞是危险的，极度脱水将造成细胞死亡。冷冻干燥微生物细胞时，加入适宜的保护剂系统，在很大程度上避免

了冷冻干燥对细胞脱水带来的损伤。从目前的研究资料看，糖类保护剂对微生物细胞的冻干脱水更具有显著的保护作用。

Crowe 等认为，通常细胞膜中磷脂的极性端在一定程度上是以水合形式存在，而且每个磷脂的极性端与其它磷脂分子的极性端被水分子隔开。当磷脂干燥脱水时，极性端的密度增加，糖链间的范德华引力增强，平时处于液晶态的脂膜变成凝胶态，使细胞膜结构发生相变，从而导致细胞死亡。冻干保护剂，尤其是糖类保护剂的作用在于抑制质膜的相变，即在微生物细胞冻干脱水时，进行“水置换作用”，使得在有糖类保护剂存在下的干燥质膜和无保护剂存在时的水合质膜其生理特性是相似的。作者研究了蔗糖、葡萄糖、海藻糖对极端嗜盐细菌的冻干保护作用，通过对冻干后细菌的相对存活率、产紫膜生理指标、质粒遗传稳定性的测定，证明几种糖类对极端嗜盐菌具有冻干保护作用，其中以海藻糖的保护作用最佳。研究结果证明，海藻糖在嗜盐菌冻干过程中的“水置换作用”是明显的。海藻糖分子上的羟基具有与膜磷脂上的磷酸基团连接形成氢键的能力，从而阻止和限制细胞膜因脱水而融合，并降低相变温度，使脂膜不易向凝胶相转变而保持液晶相，增加膜的流动性。由于海藻糖的“水置换作用”，所以冻干过程中细胞脱水对脂膜和蛋白质的结构没有不利影响，使冻干细菌的相对存活率提高到 80% 以上。

（二）保护微生物细胞膜系统的完整性

微生物细胞膜系统的完整性关系到细胞的生死存亡。微生物细胞可以无细胞壁，可以丢失决定某种性状的质粒，也可以产生遗传变异，但决不能没有完整的膜系统。已知微生物的新陈代谢活动几乎都与膜系统直接或间接相关，膜系统是微生物重要的生命活动中心。Aronson 报道，通过膜定位电镜技术曾观察到核糖体的分布与膜的完整性密切相关。通常核糖体能以多聚体的形式结合到细菌细胞膜上，聚合到膜上的多聚核糖体具有抗核糖体酶裂解的作用，使细胞代谢需要的蛋白质得以源源不断地合成。聚合体的存在对核糖体是至关重要的，游离的核糖体易被酶解。当然，

核糖体聚合形式取决于质膜系统的完整性，如细胞膜的完整性被破坏，多聚核糖体随之解体，这必然影响蛋白质的合成，导致细胞代谢受阻而死亡。

在微生物冻干过程中，添加的保护剂系统几乎都对膜系统的完整性具有保护作用。如前面介绍过的糖类物质，主要是以“水置换作用”的形式达到保护膜系统的完整性。而天然保护剂，如血清、卵黄、脱脂牛奶具有防止微生物细胞在预冻过程中膜脂蛋白分解变性的作用。膜结构的生物物理和生物化学研究显示，在微生物中占细胞膜干重 50%～60%的脂蛋白是以 β 折叠形式存在，作为保护剂使用的血浆脂蛋白和卵黄脂蛋白也属 β 结构，两者具有良好的亲合性，其整体性由盐类和氢离子浓度协调，控制保护剂系统的离子浓度，对膜脂蛋白具有良好的保护作用。此外，天然保护剂还具有增加悬浮微生物细胞的物质浓度，达到稳定渗透压，增加粘度的效果。盐类保护剂的存在，对微生物冻干过程中保持膜系统的完整性也是必需的。作者在极端嗜盐菌的冻干保存中曾注意到，高盐环境对维持细胞结构的稳定和膜的完整性非常重要。当保护剂系统中盐浓度降低到一定程度时，引起细胞壁脱落，质膜破裂，造成细菌生理性死亡。

（三）保护微生物细胞代谢酶的生物活性

生物体内的生命活动几乎都是由酶催化进行的。由于酶的催化活性是由特异的活性基团或功能团决定，所以，不同的生物学反应由特异的酶催化进行，一旦酶的结构发生改变或活性基团丢失，催化功能也将丧失。当某一关键酶失活，会造成细胞代谢受阻而积累影响正常生理功能的某种产物。当一些关键酶失活，整个细胞内的代谢作用紊乱，细胞将面临死亡。对于结构简单的单细胞微生物，酶的种类决定其营养类型、代谢途径、生存环境；酶的活性决定代谢产物、生长速度。一切影响酶活性的因素都将对微生物的生存不利。微生物冷冻干燥时，不利因素对细胞内的酶活性造成影响是肯定的，加入保护剂系统，不同程度地消除了对酶活性的影响，使微生物细胞在冻干后仍能恢复生长。目前尚无敏感的方

法直接证明冻干对微生物细胞内酶活性的影响，但有很多报道证明，微生物细胞内的一些重要酶类对冷冻干燥敏感，如过氧化氢酶、乳酸脱氢酶、磷酸甘油脱氢酶、磷酸葡萄糖变位酶、琥珀酸脱氢酶、ATP 酶、脂酶等都会因低温冷冻而失活，长期干燥而变性。因此，在冷冻干燥微生物菌种时，应根据微生物的特性，优选适合于冻干菌种的保护剂系统，减少冻干过程中的代谢酶损伤，提高冻后恢复生长率。

三、冻干微生物细胞的非致死性生理损伤

在自然界中，生物体内细胞的生理性损伤和致死之间的关系是非常复杂的，很难有机地将其分开。因为在自然状态下，无论是单细胞还是多细胞个体，甚至是高等生物体，它们都在直接或间接地与不利的环境条件或亚致死因素接触，其后果的严重程度受多种因素的影响，严重时生理损伤和致死间根本没有明显的界线，两者几乎是同步进行的。冷冻干燥作为一种实用的技术，虽被广泛应用来冻干微生物菌种，且效果良好。但事实上，冷冻干燥对微生物细胞的生理损伤和致死是客观存在的。一般情况下，微生物细胞的致死损伤容易被发现，并及时被清除；而生理性损伤则不易被发现，常以一种“隐性损伤”的形式存在于细胞中。有时，细胞的隐性损伤会造成生物体在生理、代谢、遗传方面的不利影响，致使生物体发生形态、表形的突变。这种隐性损伤如果发生在微生物菌种的冻干保存中，保存肯定是失败的。然而，从目前的资料看，多数情况下，冷冻干燥对微生物细胞造成的生理性损伤是暂时的，属非致死性损伤，以隐性损伤形式长期存在的例子仍为少数。多数非致死性生理损伤可以通过提供合适的营养物、极佳的培养条件在短时期内恢复。也就是说，要获得理想的冻干效果，微生物菌种的冻后恢复生长条件也不容忽视。

虽然微生物细胞在冻干过程中产生的非致死性生理损伤是暂时的，但在微生物细胞恢复生长的早期，这些生理损伤可以不同形式表现出来，有时甚至是非常明显的。概括起来，微生物细胞冻干产生的非致死性生理损伤包括以下几个方面。

献报道，大肠杆菌经过传代活化后，分别接种到含有亚剂量链霉素、氯霉素、放线菌素D的培养基中，置37℃培养30分钟，经测定发现，三种抗生素对大肠杆菌无任何抑制作用。同样条件下，冻干后的大肠杆菌对三种抗生素的敏感性显著增强，细菌恢复生长率直线下降，含氯霉素的一组为25%，链霉素的一组仅为0.1%，放线菌素D的一组也只有10%。在用脱氧胆酸钠作生长抑制测定时，也发现有类似的抑制作用。但是，在无任何生长抑制剂存在的情况下，冻干大肠杆菌的恢复生长明显加快，其生长百分率达到70%以上。显然，冻干大肠杆菌增加了对生长抑制剂的敏感性，直接影响了恢复生长率，这与冻干细菌非致死性生理损伤恢复期的蛋白质合成、RNA的合成被抑制密切相关。

四、微生物细胞中水分残存量对贮存活性的影响

微生物菌种冷冻干燥的贮存效果，在很大程度上取决于样品中细胞的含水量，过高或过低的含水量均影响贮存效果。在冻干微生物菌种、菌苗时，严格控制细胞含水量显得尤为重要。通常情况下，大多数微生物菌种冻干后的含水量以2%～3%为佳；高于5%时，贮存期限相应缩短；细胞含水量超过10%，微生物菌种在贮存中将迅速死亡，复水时也不易溶于水。可见，冻干微生物细胞中水分残存量与贮存稳定性和贮存期限有密切的关系。但在实际应用中，经常发现微生物细胞中水分残存量与贮存稳定性的关系有种属差异，像耐干燥的酵母菌、芽孢细菌在含水量偏高时仍可存活几年，甚至十几年；而肠道细菌冻干细胞中含水量高于10%时，贮存一年活性显著下降。至于各种细菌的含水量的确定，只有通过贮存实验确定。

（一）微生物细胞水分残存量与贮存稳定性的关系

冻干微生物的贮存稳定性指标应包括微生物的存活性、遗传稳定性、生理特性稳定性、形态特征稳定性等。如果任何一种特性在贮存中丢失或变异，可视为贮存不稳定性。如前所述，冻干微生物贮存中的稳定性很大程度上取决于细胞中水分残存量，过高的水分残存量比低的水分残存量对细胞的危害更大，它可明显加快

细胞的死亡，影响细胞的复水生存率。就某种微生物而言，冻干细胞中水分残存量与贮存稳定性存在一定的规律性。假如以微生物细胞中水分残存量(%)为横坐标，贮存期的微生物存活率(%)为纵坐标作图，可以得到细胞生长的曲线图。作者研究了5株极端嗜盐菌冻干含水量与贮存稳定性的关系，发现细菌细胞的水分残存量以2%～3%为佳(图2-1)。

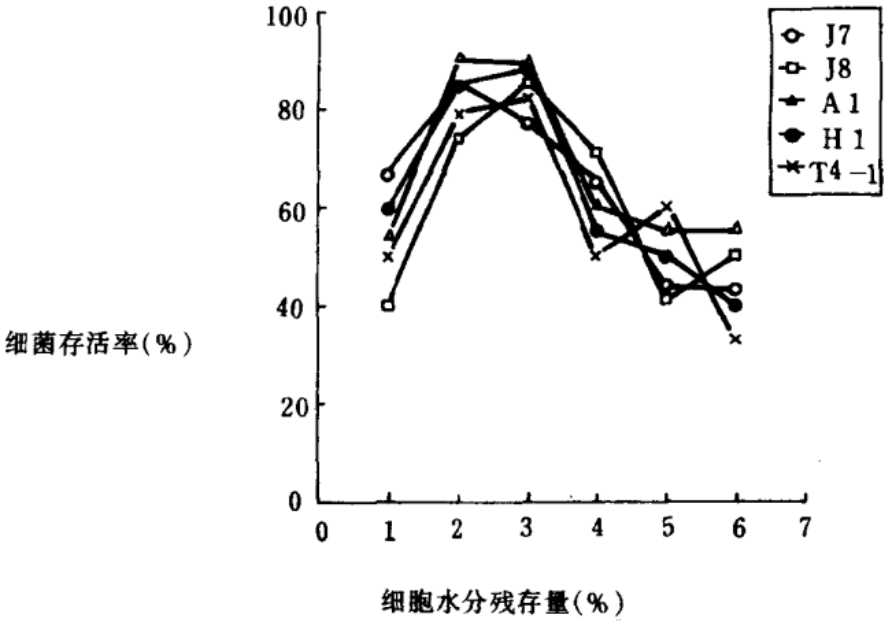


图2-1 冻干嗜盐细菌细胞水分残存量与贮存稳定性的关系

(二) 微生物细胞水分残存量与贮存期限的关系

采用冷冻干燥技术保存微生物菌种及有关生物制品，就是为延长贮存期限，达到长期保存的目的。一般认为，冻干微生物细胞水分残存量对贮存期限的影响无种属特异性，但与贮存温度相关，尤其是贮存在较高的温度条件下，细胞水分残存量的影响更为明显。细胞水分残存量高时，贮存期限几乎是直线下降。如以微生物菌种的贮存期限(年)为横坐标，贮存期中细胞存活率(%)为纵坐标，可以制作不同微生物菌种冻干贮存趋势图，趋势图中曲线的倾斜度视不同的细胞水分残存量、贮存温度而差异明显。

五、冻干导致微生物细胞致死损伤的机理

迄今为止，没有一种微生物细胞经冷冻干燥后仍100%地保持存活，微生物在冻干过程中的致死损伤是不可避免的。完善冻干程序，优化冻干条件，加入冻干保护剂只能是减少致死损伤。如前所述，微生物细胞结构与功能的相对统一对于冷冻干燥具有有利的一面，但也存在不利的一面，冷冻和干燥的环境条件骤然变化使冻干的一些细胞结构造成损伤，从而影响其功能的正常发挥。在此，仅重点介绍冻干对细胞造成损伤的机理。冻干导致微生物细胞致死损伤可从两个不同的侧面去认识，一是从冷冻干燥技术的角度去认识，分为冷冻过程导致微生物细胞的损伤、干燥过程导致微生物细胞的损伤；二是从微生物细胞受损伤的程度方面去认识，分为细胞的生理性损伤（冰晶形成，盐浓度改变）、细胞膜透性改变损伤、代谢调节作用损伤等。两者间在因果关系上没有质上的差别，故本节介绍的内容从冷冻和干燥的侧面，认识微生物细胞的致死性损伤问题。

（一）冷冻对微生物细胞的致死性损伤

微生物细胞的冻干损伤，首先发生在微生物细胞的冷冻（预冻）期间。预冻对微生物细胞冻干效果至关重要，不能提供有效的预冻条件，随后的冻干过程将加速细胞损伤或死亡。有效的预冻条件能减少微生物细胞的损伤，以利于冻干过程中的水分升华，增强冻干效果。预冻对微生物细胞产生致死性损伤，其机理是非常复杂的，目前尚无统一的理论，但一般认为主要是由机械效应和溶质效应引起。

（1）机械损伤效应　机械损伤效应是细胞内外冰晶生长而产生的机械力量引起的，特别是对于微生物细胞影响较大。一般冰晶越大，细胞膜越易破裂，从而造成细胞死亡；冰晶小，对细胞膜的机械损伤也较小。冰晶是纯水物质，故微生物细胞预冻过程中，细胞内外的冰晶形成首先是从纯水开始，冰晶的生长逐步造成电解质的浓缩。其间经历了纯水结冰、细胞质中盐浓度不断增高、胞内pH值和离子强度改变、潜在的不利化学反应发生率提高的变化过程。在预冻过程中，不利冰晶的大量形成，对细胞膜系统造成的机

械损伤是直接损伤膜结构，从而影响细胞的生理、代谢功能的正常发挥。

(2) 溶质损伤效应　溶质损伤效应是由于水的冻结使细胞间隙内的液体逐渐浓缩，从而使电解质的浓度显著增加。细胞内的蛋白质对电解质极为敏感，尤其是在高浓度的电解质存在时，会引起蛋白质变性，丧失其功能，增加了细胞死亡的可能性。此外，细胞内电解质浓度增加还会导致细胞脱水死亡。间隙液体浓度越高，引起细胞的破坏就越厉害。溶质损伤效应在预冻的某一温度范围内最为明显。这个温度范围在水的冰点和该溶液的全部固化温度之间，若能以较高的速度越过这一温度范围，溶质损伤效应所产生的不良后果就能大大减弱。

另外，冷冻时，细胞内外形成冰晶的大小程度还会影响干燥的速率和干燥后产品的溶解速度。大的冰晶有利于干燥升华，小的冰晶则不然。但大的冰晶溶解慢，小的冰晶溶解快。冰晶越小，干燥后越能反映产品的原来结构。也就是说，避免体积过大的冰晶形成，是防止细胞损伤的关键所在。

综上所述，预冻对微生物细胞的致死损伤，无论是机械性的，还是溶质性的损伤效应，最为常见的是导致膜系统直接损伤。从机理讲，膜系统的损伤取决于膜的融合和从液晶相向凝胶相转变的严重程度。通常膜融合的结果导致异形混合物的出现，膜的相变直接造成膜的透性增加。无论哪种损伤形式均使细胞内的物质和胞外水溶性物质无控制地进行双向交换，这是细胞营养代谢中最忌讳的物质交换方式。但这种形式又是微生物细胞预冻时最易发生的。

预冻对微生物细胞造成生理性损伤的常见现象是使细胞内某些重要蛋白质变性失活，尤其是具有生物活性的酶蛋白或抑制因子。酶和抑制因子的失活，使微生物细胞正常生理代谢调控失灵，出现不利物质大量积累，对细胞造成毒害作用；或使必需营养物大量分解，造成细胞“饥饿性”损伤。轻微的生理损伤可以在恢复生长期修复；严重的生理损伤对微生物细胞是致死性的，直接影响冻

干效果。

（二）干燥对微生物细胞的致死性损伤

干燥对微生物细胞的致死性损伤因其不同的种而异，具有芽孢的细菌、真菌孢子、耐干燥酵母细胞对干燥的耐受力非常强，它们可以在几十度，甚至上百度的温度下干燥而不受损伤，还可在自然干燥条件下生存几十年。应该说，这些微生物采用冻干保存效果甚佳，冻干对这些微生物的致死损伤相对小得多。除此之外，多数微生物对干燥比较敏感，尤其是革兰氏阴性细菌、真菌的营养菌丝对干燥更为敏感，如淋病球菌在干燥状态下，几小时就死亡。干燥对微生物细胞的致死损伤有时发生在干燥过程中温度过高时，有时发生在干燥使细胞异常脱水时，还有时发生在干燥细胞的贮存期内。冻干保存微生物菌种，几种干燥效应并存，无论发生哪种效应对菌种保存都是不利的。当然，从技术特征分析，冷冻干燥中的干燥过程与普通干燥明显不同，真空及有保护剂存在下的冷冻干燥对微生物细胞的直接损伤较普通干燥小得多，冷冻干燥的水分是经升华而去除的；而普通干燥往往是一种高温水分蒸发过程，两者的水分去除方式不同，效果也截然不同。

水分对于维持微生物的正常生命活动是必不可少的。对于不耐干燥的微生物，冷冻干燥对细胞造成的致死损伤也可能是细胞缺水而引发的生理损伤；耐干燥微生物的损伤则可能是膜系统结构改变或是组成变化造成的损伤。有报道证明，冷冻干燥对微生物细胞膜系统组成，特别是脂肪酸组成的变化影响显著。冷冻干燥过程中，微生物细胞膜脂肪酸的不饱和度、链的长度、链的分支状态或环绕状态存在动态变化，脂肪酸的动态变化与膜流动性密切相关。微生物细胞的干燥损伤，很大程度上是由于膜脂的性质、结构、功能的改变使膜的流动性或完整性改变，导致膜的功能失调，影响微生物的生命活动。

§2.3 生物材料超低温冻存的细胞学基础

一、细胞的冻结与超低温冻存

超低温保存生物样品的主要对象是细胞材料，即使是高等生物的组织、器官、胚胎的保存，评估指标也是以细胞学为基础的。因此，生物材料的冻存，首先是细胞冻结问题，一切影响细胞冻结的因素，都是冻存时必须考虑的。或者说，凡是对细胞冻结不利的技术都避免使用。所谓细胞的冻结，实际上是细胞内外水的冻结，水冻结中的变化过程、冻结状态对细胞生活力影响极大。

（一）水的冻结

生活细胞中含有大量的水分，约占细胞总重的60%～90%。与环境中的水存在形式不同，细胞中的水有游离水和结合水之分，其中游离水约占90%，比较容易冻结，一般在温度降至－25℃左右时，游离水就完全冻结了。结合水存在于生物大分子之间，细胞处于－100℃超低温下，结合水仍处于非冻结状态。由于细胞内水的存在形式、冻结状态直接影响生物材料的冻存效果，所以细胞内水的存在形式、冻结状态是低温生物学中研究的重点。在低温生物学基础研究中，还习惯按细胞内水的运动状态来讨论水的结构与性质，即将细胞内的水按结构分三层，或叫三种运动状态。细胞内与蛋白质、核酸、脂质等大分子和细胞器直接结合的水，称为A层水分子。A层水分子规则排列，热运动受到束缚，甚至在－100℃也不冻结。原生质中的大部分水为B层水分子，其分子排列随A层的变化而改变，当A层水分子排列紊乱，B层水分子反应敏感，并相应变乱。B层水分子的冻结温度约为－25℃。C层水分子是细胞膜表面的自由水，无论从排列到结构上都变化很大，且受环境因素的影响。通常细胞内含水量越低，C层水分子的结构化程度越高。另外，C层水分子的冻结温度较高，一般接近环境中水的冻结温度。

纯水的冻结温度在0℃左右，细胞内游离水在－25℃左右冻

结。由于水的性质不同，不但冻结温度差异很大，而且冻结的状态也显然不同。纯水冻结形成同质冰核（冰晶）；而细胞内的水以水溶液的状态存在，含有多种溶质（异物），冻结形成的冰核为同质和异质两类。两类冰核的多少与很多因素有关，其中水里存在不溶性异物的量是影响异质冰核形成的因素。此外，就水的冻结而论，水的不溶性异物越多，水的体积越大，冻结温度越低。

（二）水溶液的冻结

溶液中由于溶质的存在而改变了水的物理性质，使其需要冷却到水的冰点以下才开始冻结。溶液的冻结过程，一般从过冷开始，随着冷却溶液中冰晶的生成，潜热不断产生，使温度骤然上升，水不断结冰，不断释放潜热，直至达到共晶点，即饱和溶液的凝固点。溶液冻结形成冰晶的状态与溶质含量和降温速度呈正相关，增加溶质浓度，加快降温速度，可以获得玻璃化冰晶。实验证明，50%的明胶或70%以上的甘油溶液进行快速冻结时，能形成玻璃化冻结状态。目前，玻璃化冻结技术已用于动、植物细胞、组织、器官、胚胎等的冻存，具有广阔的应用前景。

（三）生活细胞的冻结

细胞内冻结和溶液的情况一样，通常在0℃以下过冷共晶点。但细胞冻结不仅限于细胞内冻结，胞内冻结之前首先是胞外冻结。二者的冻结由冻结条件，特别是冷却速度决定。

（1）细胞外冻结　冻存生活细胞均以液体悬浮状态开始，悬浮细胞的液体多为含低温保护剂（甘油，DMSO）的冻存液。尽管冻存液的溶质成分或浓度可因待冻存细胞（动物细胞、植物细胞、微生物细胞）的不同而有所差别，但可以肯定，无论那种冻存液，它们含活化冰晶的异物远比细胞内要多，所以，悬浮细胞的冻结首先是细胞外冻结（冻存液冻结）。此外，细胞内原生质的化学组成和物理性质的特殊性导致存在于狭小空间的水结冰较为困难也是细胞外首先冻结的原因之一。

细胞外冻结受两种降温速率的影响：一种是同速降温，即细胞表面的冷却速度很小，胞外结冰缓慢，从而连续有热发生，使胞内

的水分以很大速度流向胞外，减缓了胞外冻结速度。同速降温过程中，冰的生成与热的发生同冷却速度同步进行。另一种是慢速降温冷却，冷却速度明显慢于冰的生成和热的发生，增加了细胞内的水向胞外溢出的速度，使细胞在短期内不易结冰而脱水，适度的细胞内脱水对冻存是有益的。根据细胞外结冰与降温速率之间的关系，Luyet 首先提出冻存生物细胞的二步冻结法，即先对细胞慢速降温(1.0℃/min)到 -30℃，造成细胞外冻结，细胞内脱水，然后提高降温速度(5～10℃/min)降到 -100℃以下，将细胞快速移到液氮长期保存。二步降温冷冻法已被众多学者所接受，广泛用于生物材料的长期冻存。

(2) 细胞内冻结　细胞悬浮在常规浓度的低温保护剂中，采用二步降温冷冻法或慢速降温冷冻为宜。快速降温容易使细胞内过早结冰或冻结，一旦细胞内过早冻结，对细胞有破坏作用，造成细胞结构的破坏，原生质浓缩，脱水呈网状。细胞融解后，可观察到细胞崩坏的残骸，胞内空泡增加。可见，细胞内的快速冻结对细胞长期冻存是不利的。当然，玻璃化冻存技术例外，玻璃化冻存除提高保护剂浓度外，还需加快降温速度(1000～10000℃/min)，使细胞内水冻结冰晶体积非常小，出现玻璃状的冻结现象，这样才能使细胞免受伤害，达到细胞冻存的目的。

(四) 细胞的超低温冻存

如前所述，细胞内外水的冻结状态是细胞冻存技术的关键。理论上讲，细胞外水的冻结温度为 -5～ -15℃，细胞内游离水在 -25℃冻结，-30℃时，细胞几乎没有非冻结状态的自由水存在，而结合水在 -100℃温度下也不冻结。根据 Luyet 的冻结理论，细胞游离水的冻结温度(-30℃)可被认为是细胞冻存的安全温度，因细胞的二步冻结法是以 -30℃为基础的，在如此温度条件下，细胞可以达到冻存的目的。但事实上，细胞冻存的检测结果并非如此，即便是在 -70℃条件下，冻存细胞(尤其是动物细胞和植物细胞)也不能达到长期保存的目的；只有在 -196℃的超低温条件下，细胞的冻存才是安全、可靠的。由此看来，细胞的超低温冻存，不

仅仅是低温生物学的问题，还涉及细胞生物学理论。从细胞的生理特性看，在－70℃以上，细胞内某些酶类还具备一定的活性，使细胞进行简单、缓慢的代谢，结果使细胞出现“衰老”现象。另外，温度的波动也会产生物理和化学反应，使细胞受到不同程度的损伤。细胞在－196℃下冻存，有效地避免了上述现象的发生。可见，细胞的冻存除考虑细胞内外水的冻结及冻结可能造成的损伤外，还要考虑细胞本身的生物学特性，否则就难以达到长期保存的目的。

二、细胞超低温冻存后致死损伤问题

细胞超低温冻存实际上由三个技术手段组成：一是细胞预冻；二是细胞在－196℃下长期贮存；三是细胞冻融。正如前面讨论的那样，细胞在－196℃下贮存是安全、有效的。如果说细胞超低温冻存后出现致死损伤的话，那肯定是发生在预冻和冻融期间，而这种由预冻和冻融引起的细胞变化或损伤是可以通过完善和改进技术程序尽量避免的。所以讨论细胞超低温冻存的致死损伤问题并不意味是否定超低温冻存技术的实用性。目前认为，导致细胞超低温冻存的致死损伤，主要是采用非标准的冻存程序，细胞的结构与功能受到严重损害，致使冻融的细胞难以恢复生长而死亡。细胞的损伤是全方位的，有的是膜系统的完整性受损，有的是亚细胞结构受破坏，有的也可能是代谢酶失活。

§2.4 低温免疫研究的细胞学基础

低温医学的广泛深入研究，促使低温免疫（cryoimmune）这一概念应运而生，且不断被人们所接受。迄今，低温免疫研究已渗透到基础免疫学、肿瘤免疫学、组织移植免疫学、低温外科学等领域，并在理论与应用研究方面取得长足进展。

一、肿瘤冷冻治疗中的免疫变化

严格地讲，早期发现及涉及低温免疫问题的先驱者并非免疫学家，而是从事低温医学及冷冻医疗的专家。冷冻医疗专家在进

行冷冻治疗时发现，肿瘤组织经超低温（液氮）快速冷冻时，1～3分钟后便可使病变组织细胞造成不可逆的致死性损伤，随后，冻伤之坏死组织或肿瘤细胞作为自身特异性抗原，刺激机体产生特异性细胞免疫和体液反应，从而增强机体抗肿瘤免疫力，结合其他抗肿瘤药物治疗，可显著提高肿瘤治疗效果。其后，这种低温免疫反应的存在已在前列腺癌、恶性黑色素瘤、晚期宫颈癌、甚至胃癌和乳腺癌的冷冻治疗中得到证实。因此，Bory 等提出了冷冻治疗恶性肿瘤时，机体中免疫作用的可能途径：

超低温冷冻治疗肿瘤→形成坏死肿瘤组织→释放自身组织特异性抗原→激发机体的特异性免疫→产生抗体或淋巴因子→抑制残余肿瘤组织生长→增强机体抗肿瘤免疫力。

二、外周血单个核细胞（PBMCs）冻存后的免疫应答

液氮超低温冻存方法是目前长期保存动物细胞的最佳方法，在免疫学研究中，广泛用于免疫细胞、外周血细胞、骨髓细胞、杂交瘤细胞的长期保存，致使很多回顾性免疫学研究、骨髓移植、单克隆抗体的长期制备能常规进行。一般认为，标准超低温冻存技术是安全、可靠的，不影响其冻存细胞的功能，也不会造成遗传性状的改变。进入 90 年代，美国的 Veekataraman 等人以外周血单个核细胞（PBMCs）为材料，研究了这类细胞冻存后的免疫应答，结果证明，PBMCs 经冷冻后，显著增强了分泌 IL－1、IL－6 和 IFN－r 能力，其培养上清液中细胞因子的含量高出新鲜对照的几十倍，甚至几百倍。进一步的研究证实，在 PBMCs 冻融过程中，那些对低温敏感的抑制细胞会受到不同程度的冰冻损伤，使其丧失免疫抑制活性，从而使用 PHA 刺激或 LPS 激活的单核细胞、淋巴细胞分泌 IL－1、IL－2、IL－6 和 IFN－r 的功能失去免疫调节控制作用，造成细胞培养上清液中的细胞因子积累。Veekataraman 等人的研究提出了一个新的低温免疫问题，提醒免疫学研究者在冻存特殊功能的免疫细胞时要小心谨慎。另外，这一研究结果对于深入研究 PBMCs 冻存后的免疫机理也具有重要参考价值。

三、冻存器官对宿主移植免疫排斥反应的效应

多年来,器官移植一直存在两个重要的问题,即器官来源困难和宿主移植排斥反应。眼球、皮肤、胰腺、骨髓等器官、组织的超低温保存成功,大大缓解了临床上对这些器官的需求。而环孢菌素A.FK506等强效免疫抑制剂的临床应用,使移植免疫排斥反应得到有效控制。然而,对于器官移植宿主而言,长期使用免疫抑制剂虽然控制了排斥反应,但随之而来的是机体免疫机能下降,抗感染能力减弱,增加了并发其他感染疾病的危险性。所以,通过其他途径降低移植免疫排斥反应始终是急待解决的课题。近两年,低温免疫实验研究对于改善移植排斥反应取得较大进展。

Ingham等将小鼠的皮肤进行适当处理,浸泡于15%DMSO冻存剂中,以30℃/min的降温速率降温到-150℃,贮存于液氮。检测结果发现,冻存后的皮肤不仅活性很高,而且异体移植后免疫排斥反应显著降低。

Natkunam等进一步证明,用1℃/min的降温速率冻存小鼠心脏瓣膜时,移植后的免疫排斥反应较强;而采用10℃/min的降温速率冻存心脏瓣膜,异体移植免疫排斥反应明显减退。体外测定结果也充分显示,采用不同降温速率的程序冻存小鼠心脏瓣膜,其免疫原性存在显著差异,加快降温速率可有效降低冻存器官异体移植的免疫排斥反应。因此,Natkunam等认为,在心脏瓣膜中,表达MHC-2抗原的树突状细胞(dendritic cell)在同种异体移植免疫反应中起关键性作用,它可非特异性地刺激移植宿主的淋巴细胞产生免疫排斥反应。而用快速降温(10℃/min)技术冻存心脏瓣膜时,发现其中的树突状细胞冰冻损伤极为严重,免疫刺激功能显著下降,移植排斥的反应显著减弱。

综上所述,低温冻存对免疫应答的影响是存在的,并且,免疫应答不仅与免疫细胞有关,还涉及很多效应细胞。故可以肯定,低温免疫的研究是以细胞学为基础的,通过改进冻存程序,可使这种对细胞特性的影响处于预期的最佳状态。

§2.5 生物材料低温保存与遗传稳定性的关系

生物材料低温保存的遗传稳定性是种质、种株保存中最关注的问题。遗传稳定性始终作为选择保存方法、确定保存条件的最重要指标，一切可供使用的保存技术都是以能保存生物材料的遗传稳定性为前提的，如4℃的低温能有效地保存很多生物材料，且设备简单，经济适用。但从遗传稳定性的角度出发，人们宁愿花成百上千倍的费用，建立－20℃、－40℃的冷库，用于种质或生物材料的长期保存。另外，从理论上讲，－25～－30℃的低温冻结可使生物材料达到保存的目的，也是基于保持生物材料遗传稳定性的考虑，低温生物学家一致推荐采用液氮超低温技术冻存生物材料。迄今，人们对生物材料低温保存的标准技术给予充分肯定，特别是对于保存中的遗传稳定性问题，许多学者作了大量的研究和对比分析，取得较好的结果。

一、染色体结构的稳定性

标准的低温保存方法使生物材料的染色体结构保持稳定，而错误的操作程序或非标准保存技术的使用则对细胞染色体结构造成损伤。郑斯涌在冻存人外周血淋巴细胞时，在无低温保护剂的状态下，在0℃、－20℃冷冻3分钟，结果发现0℃组的淋巴细胞染色体结构畸变率为31%，－20℃组高达49%。畸变主要表现为细胞变形、膨胀、破碎；染色体双着丝粒频率增加，并出现较多无着丝粒断片和环状断片。而加10%二甲亚砜作为保护剂的淋巴细胞，在液氮贮存3个月，其染色体结构与新鲜对照组无差异。郑向黎则采用标准程序降温、液氮长期冻存人肺二倍体细胞，以不同的温度解冻，用常规方法制备染色体标本片和G带显色，显微镜观察结果如表2－1所示。

由此可见，低温诱导细胞染色体畸变的现象是存在的，但在生物材料低温保存中，可以通过加入低温保护剂、完善降温程序、控制解冻温度而避免细胞染色体的畸变。换句话说，采用标准的方

法冻存生物材料，染色体结构具有高度稳定性，即使有少数细胞染色体发生微量变化也是可逆性的，可以在以后的恢复生长中加以修复。

表 2－1　　解冻温度对细胞染色体结构的影响

编　号	解冻温度(℃)	细胞染色体结构变化
1	20	70%以上细胞染色体溶解
2	30	50%左右的细胞染色体溶解
3	40	60%～70%细胞染色体形态正常
4	50	50%左右的细胞染色体溶解

二、染色体数目的稳定性

通常高等生物的染色体数目是相对稳定的，并且可以通过细胞化学方法加以鉴别。物种的染色体数目不变决定其遗传性状的稳定性。低温保存的目的，也就是要让物种的遗传性状保持稳定。尽管很多自然因素会导致物种染色体数目的改变(出现单体、非整倍体染色体组)，但是深低温，尤其是超低温冻存会改变高等生物材料细胞染色体数目的报道不多。石思信等报道用－196℃超低温冻存玉米花粉 2 年以上，授粉后的 F1 代细胞染色体数目完全正常，且无染色体易位现象出现。梁继霞等用低温保存土豆试管苗的结果也证明，标准的低温保存方法不会使生物材料的染色体数目发生改变，所以保存方法是稳定、有效的。

三、质粒的稳定性

质粒是微生物重要的遗传物质，存在于染色体之外，且能自我复制，作为遗传工程的载体被广泛应用。野生型质粒、抗药性质粒、重组质粒、致病性质粒是微生物细胞内质粒的几种重要存在形式。这些质粒的存在赋于微生物细胞不同的特性。一般认为，微生物细胞内的野生型质粒、致病性质粒是比较稳定的；而抗性质粒，尤其是重组质粒的稳定性比较差。所以，人们一直关注微生物质粒的稳定性问题，其中微生物长期保存中的质粒稳定性问题的讨论由来已久。所幸的是，已有众多的文献报道，结果是肯定的，

微生物长期保存，其质粒稳定存在。从现有的文献看，微生物长期保存与质粒稳定性存在保存方法上的差异，冷冻干燥保存、液氮保存对微生物质粒的稳定性有一定的影响。就群体而言，两种保存

表 2－2　　大肠杆菌液氮冻存及其质粒稳定性

大肠杆菌菌株（含抗性质粒）	冻存前的菌数	冻存后大肠杆菌活性（%）（含 25μg/ml 抗生素的 LB 平板计数）				
		1 周	1 个月	6 个月	1 年	2 年
RY13(pMB3)	5.4×10^{9}	109	48	76	87	80
CR34(pSC10)	9.1×10^{7}	92	105	113	100	105
K12W3110(pML2)	1.0×10^{10}	140	130	110	120	110
K12W3110(RP4)	8.6×10^{9}	63	81	87	99	84
K12J53－1	4.5×10^{9}	98	82	96	73	84
K12J.53(JR66a)	5.3×10^{9}	59	94	89	70	79
W677(R799)	1.3×10^{10}	77	85	73	59	77
C603(pML21)	2.6×10^{9}	119	119	92	62	92

表 2－3　　微生物冷冻干燥保存及其质粒稳定性

菌种名称	冻干前质粒检出（%）	冻干后质粒检出（%）
大肠杆菌（含抗性质粒）		
RY13	99	51
CR34	100	51
K12W3110	98	36
W677	100	62
极端嗜盐菌（含普通质粒）		
S_9	100	32
J_7	97	45
T_{4-1}	100	39
RF_1	100	62
啤酒酵母（含重组质粒）		
NA79－10C/pAL109	99	82
NA87－11A/pAT90	105	72
NA75－2A/pAL_2	90	87
NA79－10C/pAL51	85	80

方法均可用于微生物的长期保存，其中仅存在复苏百分率的差异，不存在质粒完全丢失的问题，只要有一定数量的细菌质粒稳定存在，就可获得大量的群体。但从单细胞受损伤的角度去分析，发现冻干对单细胞的损伤要大得多。对于复苏百分率的降低有两种解释：一种是细菌细胞受损严重导致死亡率增加；再就是抗药性质粒丢失，使细胞不能在加抗生素的培养基中恢复生长。保存对质粒稳定性的影响在大肠杆菌、极端嗜盐菌、酵母菌中都比较明显（表2－2，表2－3）。

四、DNA分子的稳定性

DNA是遗传的物质基础，它们在细胞内以两种形式存在：一种 存在于细胞核内（真核生物）；另一种以拟核形式存在（原核生物）。真核细胞中的染色体、细胞质遗传载体均存在完整的DNA分子，此种情况下DNA分子受到核蛋白的保护，在遇到外部环境激烈刺激时，尽管会发生染色体结构、数目的变化，造成染色体畸变，但畸变的染色体仍能遗传并表达性状，故可以认为，畸变染色体的DNA分子是完整的。超低温冻存是否会造成真核细胞DNA分子的不可逆损伤，这是倍受关注的问题。采用同位素标记的胸嘧啶核苷掺入法，可客观地反映DNA分子的损伤程度。从国内外的许多报道看，标准的超低温冻存不会引起真核细胞染色体DNA分子的损伤，更不会引起基因的不可逆突变。然而，原核细胞中的DNA分子比较容易受外界条件的影响，产生分子结构改变、基因突变等变化。Sinskey曾报道，经冷冻干燥后的大肠杆菌细胞内的DNA分子存在不同程度的损伤，编码某些代谢酶的基因甚至会发生突变。这种DNA分子的损伤或基因突变不同于辐射造成的伤害，它们中大部分损伤是可逆的，能够在恢复生长期逐渐修复，不会出现表型上的遗传效应。但是，少数的致死损伤（细菌死亡）或隐性损伤、微量损伤是客观存在的。有些DNA产生微量损伤会影响代谢产物的积累（次生代谢产物），这方面的例子很多，诸如谷氨酸、核黄素、抗生素产生菌的冻干都会影响产量。相比之下，液氮冻存所造成的DNA损伤就微乎其微。Ashwood－

Smith 对在液氮中冻存 11 年之久的三株营养缺陷型细菌(*E. coli* trp^-、*E. coli* lac^-和 *S. typhimnrium* TA 98 his^-)进行了遗传分析,发现缺陷性状稳定遗传。由此可见,标准的低温保存技术对 DNA 分子的稳定性极为关键。

第3章　低温生物学研究的物理化学基础

§3.1　低温保存与低温损伤

一、低温保存

生物体能在低温下长期保存是因为低温能抑制生物体的生化活动。生物体内一切新陈代谢过程中的化学变化，虽大多数由酶所催化而表现出各种特殊形式，但仍然都服从于某些共同的物理化学规律。著名的瑞典物理化学家 S. A. Arrhenius(1859－1927)研究了温度对化学反应速度的影响，得到了如下的 Arrhenius 关系：

$$K = A \cdot \exp(-E_a/RT) \qquad (3-1)$$

式中，K 是反应速率；R 是气体常数；T 是绝对温度；E_a 是活化能(activation energy)；A 则称为 Arrhenius 因子，对于给定的反应，A 是个常数。

式(3－1)可以改写为下列形式：

$$\ln K = \ln A - \left[\frac{E_a}{R}\right]\frac{1}{T} \qquad (3-2)$$

对于给定的反应，若以 $\ln K$ 和 $1/T$ 分别作纵、横坐标，那么上述关系应为向右方下斜的直线。许多酶反应速率、心搏速率、呼吸速率、神经冲动传播速率、变质反应速率等试验都已经证实了上述关系。

根据一般推荐的活化能 E_a 的数值，就可以算出反应速率 K 随温度降低而衰减的情况。按此也可以推算出生物变质速率与温度的关系。举例来说，若一生物体在 4℃ 环境下能存活 2 小时，那么按理论上说，它在 －40℃ 下能保存数日，在 －80℃ 下可保存数

月，而在－196℃（液氮温度）下可望保存几个世纪。

60年代，美国纽约血液中心主任A.W.Rowe实现了人体红细胞的低温保存。1980年，他将在液氮温度下保存了12年的红细胞复温后进行检查，没有发现任何生化和功能上的变异。这实际上证明了生物材料可以在低温下长期保存。

1981年，美国麻省理工学院低温生物实验室主任E.G.Cravalho等将红细胞的温度一直降至－272.29℃，复温后未见任何变异。这说明低温保存并未发现有温度的下限。从Arrhenius关系来分析，温度越低，可保存的时间就越长久，但要达到液氮温度以下，耗费很大。所以从实用观点来说，－196℃已足够了。

生物体虽能在低温下长期保存，但却极容易在降温和复温过程中受溶液冻结、融化以及溶液渗透压力变化等因素的作用而损伤。这种低温损伤主要发生在0～－60℃这段温度范围内，我们称这个温度范围为“危险温度区”。

为了实现细胞的低温保存，一般均需在溶液中加入一定种类的低温保护剂（cryo－protective agents），如甘油、二甲亚砜等，并针对不同的细胞，设计特定的降温程序和复温程序等。没有上述特定的条件，细胞在降温复温过程中必然会遭到低温损伤而死亡。

二、最佳冷却速率

从1949年起，人们经过约20年的探索，发现针对不同的细胞和不同的低温保护剂溶液，存在着数值各不相同的最佳冷却速率。当冷却速率在此值附近，低温保存的存活率达到最大值。Mazur综合了几种细胞的存活率与冷却速率的关系，如图3－1所示。

虽然以后的研究提高了存活率，而且发现采取不同的保存方案也可改变细胞的最佳冷却速率的数值；但是此图的重要意义在于告诉人们，对于某一种细胞和某一确定的保存方案，确实存在着某种最佳冷却速率，对应最大的存活率；而过快或过慢的冷却速率都会导致细胞的损伤，降低存活率。

三、关于冷却过程细胞受损伤的两因素假说

关于过慢的冷却过程使细胞受损伤致死的原因，曾有许多科

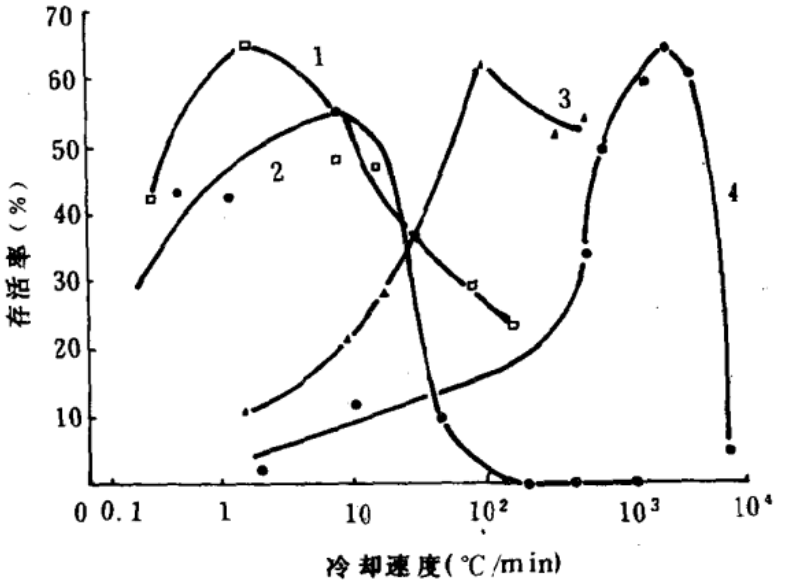


图 3－1　几种细胞的低温保存存活率与冷却速率的关系

1. 骨髓细胞　2. 酵母细胞　3. 仓鼠细胞　4. 红细胞

学家提出各种假说。Lovelock 认为，过慢的冷冻过程造成电解质浓度的增高，导致细胞膜脂蛋白复合体的破坏和膜的分解。Meryman 认为，当细胞膜脱水收缩达到临界最小体积时，会使细胞膜的渗透率产生不可逆的致命的增加，原先不能透过膜的溶液也变成可渗透的，造成细胞死亡。

1972 年，Mazur 等首先从中国仓鼠组织培养细胞的低温保存试验数据分析中，提出冷冻损伤的两因素假说。这个假说认为造成冷冻损伤有两个独立的因素：一是胞内冰的形成(intracellar ice damage)，这是过快冷却所产生的，冷却速率越快，此损伤越大；另一是“溶质损伤”(solute damage)或称“溶液损伤”(solution damage)，这是由过慢冷却所产生的，它使细胞在高浓度的溶液中暴露的时间过长而遭损伤，冷却速率越慢，此损伤越大。

两因素理论可以用图 3－2 形象地表示。由于此两因素的综合作用，必然就存在着某一最佳冷却速率，对应于低温保存的最佳存活率。

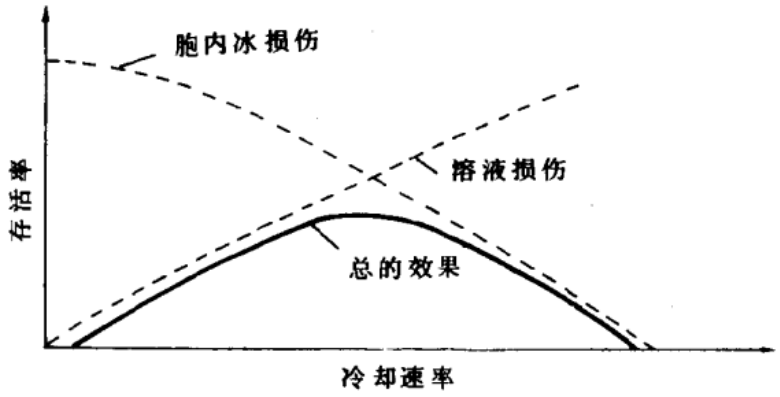


图 3－2　低温损伤的两因素假说

对于不同类型的细胞，它们的最佳冷却速率可以相差极大。因为这取决于水分渗透过程是否能跟得上降温速率；取决于细胞的表面积与体积之比，以及膜的渗透率。一般说来，结构简单的小细胞，如红细胞等，最佳冷却速率较高，可达 10^3℃/min 或更高；而结构复杂的大细胞，如直径 100μm 以上的胚胎，其最佳冷却速率只有每分钟零点几度到几度。所谓过快冷却、过慢冷却都是相对于具体的细胞而言的。例如，10℃/min 的冷却速率，对于红细胞就是过慢冷却；而对哺乳类动物的胚胎保存，则是过快冷却。

总之，过慢冷却是质量迁移起主要作用的过程，水分由胞内大量渗出，细胞剧烈收缩，但无胞内冰产生；而过快冷却是传热起主要作用的过程，水分来不及渗出胞外，大量胞内冰形成。这些情况可以形象地表达在图 3－3 中。

四、复温过程中细胞损伤

与冷却过程相比较，复温过程的研究显得薄弱得多。在许多情况下，细胞能在最佳冷却速率的情况下降至低温，然后长期储存在－196℃，但却极可能在复温过程中遭受损伤而死亡。复温过程中造成损伤的原因可能有多方面。如经冷冻后膜的渗透率变化了，可能造成渗透率过大或过小，甚至完全没有渗透功能。有的细胞虽渗透率未变，但却在复温过程中产生细胞溶解。严格地讲，正确的复温过程应是冷却过程的函数，应针对不同的冷却过程选择

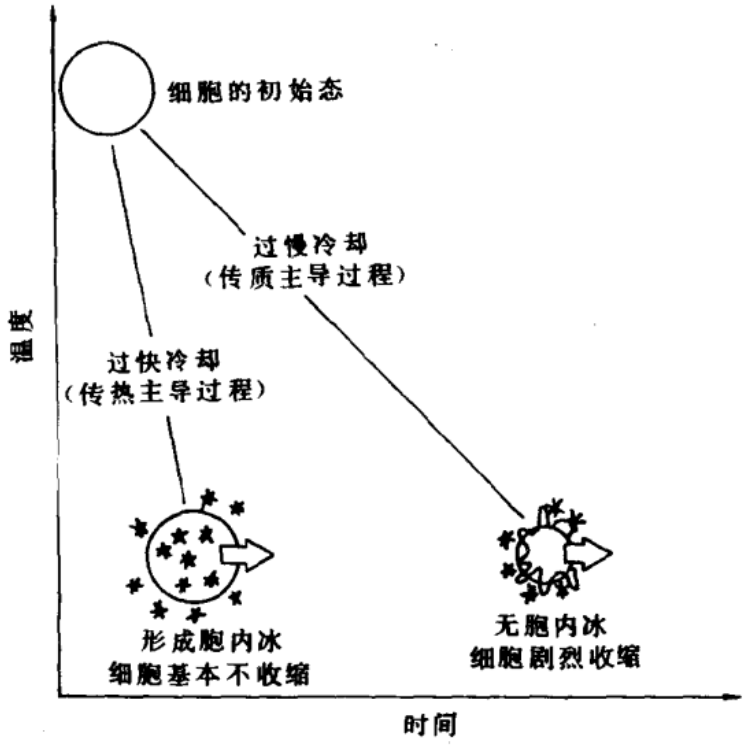


图 3-3 过快和过慢冷却的特点

不同的复温过程,但人们研究得还极少。一般建议,如冷却过程的速率较快,那么相应的复温速率也要快些,这样可获得较好的效果。在绝对值上,复温速率一般总要比冷却速率高得多。

关于形成胞内冰的过快冷却过程及其复温过程,Mackenzie 和 Bank 在 70 年代就进行了出色的研究,其结论是,在快速冷却中形成胞内冰本身对细胞并非致命的损伤,如果采取快速复温仍可能使细胞存活。但若在复温的过程中,在温度较高的区域(如 -40℃ 或更高)经历较长的时间(或进行慢速复温),则胞内冰会产生再结晶(recrystallization),而造成细胞的致命损伤。上述结论至少对酵母细胞是正确的。

五、造成损伤的其他因素

除了冷却和复温过程外,还有许多因素会造成细胞的损伤,这里仅简述其中的几种。

(一) 抗冻剂的种类、浓度及其加入、取走的方式

到目前为止，除了最简单的细菌及多数其它类型微生物以外，绝大多数细胞的低温保存都必需采用抗冻剂(CPA，cryprotective agents)，如甘油、二甲亚砜、甲醇、乙二醇、二甲基乙酰胺、聚烯吡酮(PVP)、羟乙基淀粉(HES)、聚乙二醇(PEG)、葡聚糖和清蛋白等。不同的细胞要求不同类型的抗冻剂，而且浓度也不相同，至今没找到普遍的规律。

在冷却过程前或在冷却过程中，抗冻剂被加入溶液，加入的方式有一次的，也有分几次的；各次的平衡时间、温度也有要求。在复温过程中或以后，一般要将抗冻剂溶液稀释或取走，以供移植使用。稀释或取走的方式有一次或多次的，间隔平衡时间也有要求。对于某些细胞，抗冻剂的加入和取走方式不当会引起明显的渗透压损伤，导致细胞的死亡。

(二) 过高的储存温度

储存温度降低能延长细胞保存的期限。从实用的角度来说，-196℃已是足够的了。如果有-80℃以下的低温冰箱，用于细胞的短期保存也是可以的。但是我们建议不要采取-60℃以上的低温冰箱用于活细胞的低温保存，因为在此温区内，细胞内部可能存在的极微小冰晶，会产生再结晶，或形成大的冰晶，或使冰晶在形状、方位上产生变化，对细胞内部的结构，特别是对细胞膜产生损伤，使细胞死亡。

(三) 寒冷损伤和冷休克

对于一些生物体，如某些热带和温带植物，对温度降低极为敏感，虽然温度仍高于冰点，细胞内外均无冰晶形成，仍会造成细胞的损伤。这种由于温度低于正常温度所造成的细胞损伤被称为寒冷损伤(chilling injury)。这种损伤不是立即反应的，它取决于温度的数值，而与温度的变化速率无关。造成这种损伤的机理被认为是温度降低引起膜脂肪相的变化，从而影响细胞的新陈代谢。

在温度高于冰点的范围内，还有一种损伤机制被称为冷休克(cold shock)。它对温度降低的速率极为敏感，如公牛的精子就很易受冷休克的损伤。它的特点是取决于温度变化的速率，而不是

温度本身的数值。它是立即或很快就反应出来的。冷休克损伤的机理是由于膜脂肪相的变化,改变了膜的渗透率。

§3.2 溶液的冻结特性与细胞的损伤

一、水的冻结特性

(一) 降温曲线

我们将一个内盛纯水的容器(塑料袋或安瓿中)置于降温槽内,当槽内温度以等速下降时,温度变化情况如图 3-4 所示。图中的虚线表示槽内温度,实线表示水温。纯水在 101325Pa(标准大气压)下的冰点是 273.15K(0℃),但在一般情况下,纯水只有被冷却到低于 0℃的某一温度时才开始冻结。这种现象被称为过冷(supercooling)。开始出现冰晶的温度与相平衡冻结温度之差,称为过冷度。

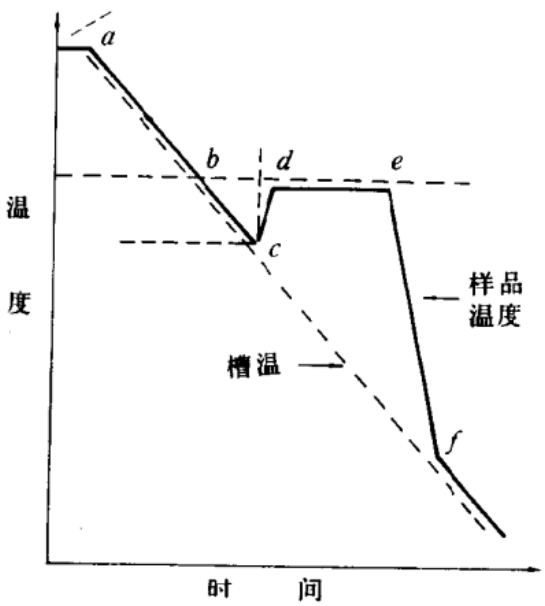


图 3-4 纯水的降温曲线

在过程 abc 中,水以释放显热的方式降温。当过冷到点 c 时,由于冰晶开始形成,释放的相变潜热使样品的温度迅速地回升到 0℃,即过程 cd;在过程 de 中,水在平衡的条件下,继续析出冰晶,

不断释放大量固化潜热。在此阶段中，样品温度保持恒定的平衡冻结温度0℃；当全部水被冻结后，固化的样品以较快速率降温。这里特别要指出，ef 段的降温速率可能远大于槽温的下降速率。在生物细胞的低温保存中，如何控制溶液固化后的冷却速率是热控制的一个重要问题和难点。

（二）过冷和成核

冰晶的成核(nucleation)过程主要由热力学条件决定，而冰晶的生长过程主要由动力学条件决定。

当水处于过冷态(亚稳态)时，可能以两种形式形成冰晶核心(晶核，nuclei)，即均匀成核(homogenous nucleation)和非均匀成核(hiterogenous nucleation)。均匀成核是指在一个体系内各处的成核几率均相等，由于热起伏(或热涨落)可能使原子或分子一时聚集成为新相的集团(又称为新相的胚芽，embryos)，若胚芽大于临界尺寸 r^* 时成为晶核。

非均匀成核又称异相成核，是指水在尘埃、容器表面及其它异相表面等处形成晶核。对于均匀成核，要求有较大的过冷度，例如，对很纯的微小水滴，已发现到 -40℃ 或更低的温度还未结冰。对于非均匀成核，所要求的过冷度比均匀成核要小得多。对于体积较大的水，一般均具有异相成核的条件，因此只要温度比 0℃ 稍低几度就能形成冰晶核。

（三）实际的冰晶形成生长过程及其对细胞的影响

上面讨论的情况是针对平衡状况的，而实际的过程是有一定的降温速率的。若降温速率较慢，则形成的冰晶核数目较少，冰晶的生长速率较快，形成数目较少但体积较大的冰晶；若降温速率较快，则形成的冰晶核较多，冰晶生长受限制，形成数目多而体积小的冰晶。

在实际降温过程中，水或溶液中可能出现较大的过冷度，也可能在释放潜热后出现很高的冷却速率(图 3－4 中的 ef 段)，这对细胞保存是很不利的。因此在低温保存的操作中，常采取“置核”(或称“种核”，seeding)的措施。具体做法是将事先浸入液氮中的

细丝取出，轻轻接触溶液的表面或容器的表面，以求在局部点上形成大的过冷度，形成晶核，以降低整体水或溶液的过冷度。

在实际降温过程中，一些实验发现生物细胞内的成核温度在-5℃到-15℃范围内。有人认为细胞内冰的形成是基于异相成核的原因，但 Mazur 认为细胞内并不存在有效的晶核。Morris 和 McGrath 认为细胞内的冰晶是由胞外溶液结晶而提供晶核的。

尽管关于胞内冰晶核形成的机理有不同的看法，但关于胞内冰形成对细胞损伤的看法是一致的。由于胞内冰在复温过程中一般难免要引起冰晶的再结晶，这将对细胞产生致命的损伤。

一、稀溶液的依数特性

两种或多种物质均匀混合而且彼此呈分子状态分布均可称为溶液(solution)。溶液可以是液态的，也可以是气态的或固态的。我们这里讨论的是由水和一种或多种物质组成的液态溶液，且将水称为溶剂(solvent)，将其他物质称为溶质(solute)。

(一) 溶液组成的几种表示法

在低温生物技术中，人们常常需要配制含多种溶质、不同浓度的低温保护剂溶液，人们又常用不同的浓度表示法。因此，首先要了解这些溶液浓度的不同表示法、它们的确切含义以及相互之间的转换关系。

(1) 摩尔分数 X_s(mole fraction，按 SI 制，应当确切地称为物质的量分数)

溶液中某一溶质 s 的摩尔分数被定义为

$$X_s = n_s/(n_{水} + \Sigma n_s) = n_s/n_{总} \qquad (3-3)$$

式中，n_s、$n_{水}$、Σn_s、$n_{总}$ 分别为该种溶质的、水的、各种溶质的以及溶液的“物质的量”，单位是 mol；X_s 是无量纲量。

(注：按 SI 制，mol 是“物质的量”的单位，若一系统中所含的基本单元数与0.012kg的 C_{12} 的原子数目相等，则该系统的量为 1mol。)

(2) 质量摩尔浓度 m_s(molality)

$$m_s = n_s/(kg_{水})$$

即 1kg 水(溶剂)中所含某种溶质 s 的摩尔数，单位是 mol/

$kg_{水}$。

X_s 和 m_s 关系是

$$X_s = n_s/(n_{水} + \Sigma n_s)$$
$$= (n_s/kg_{水})/[(n_{水}/kg_{水}) + (\Sigma n_s/kg_{水})]$$
$$= m_s/(1/M_{水} + \Sigma m_s)$$

即
$$X_s = M_{水} \cdot m_s/[1 + M_{水} \cdot \Sigma m_s] \qquad (3-5)$$

式中，$M_{水}$ 是水的摩尔质量，为 $18.015g/mol = 18.015 \times 10^{-3}$ kg/mol。

对于极稀的溶液

$$X_s = m_s \cdot M_{水} \qquad (3-6)$$

(3) 体积摩尔浓度 c_s(molarity，按 SI 制的命名，应严格地被称为“物质的量浓度”)

$$c_s = n_s/(溶液的体积) \qquad (3-7)$$

一般用单位 mol/L，即 mol/dm^3。

若已知溶液在一定状态下的密度 $\rho(kg/m^3)$，则溶液的质量为 ρV，而水和溶质的摩尔质量分别为 $M_{水}$ 和 M_s(kg/mol)。可以求得下列关系：

$$c_s/X_s = \rho(n_{水} + \Sigma n_s)/(n_{水} \cdot M_{水} + \Sigma n_s \cdot M_s) \qquad (3-8)$$

对极稀溶液

$$X_s = c_s \cdot M_{水}/\rho \qquad (3-9)$$

和

$$m_s = c_s/\rho \qquad (3-10)$$

在计算中要留意所用的单位，如 $M_{水} \approx 18 \times 10^{-3}$ kg/mol，对极稀溶液，$\rho \approx 10^3 kg/m^3$ 等。

(4) 质量分数 W_s(mass percent)

质量分数定义为该种溶质的质量与溶液总质量之比值。

$$W_s = n_s \cdot M_s/(n_{水} \cdot M_{水} + \Sigma n_s \cdot M_s) \qquad (3-11)$$

(二) 稀溶液的依数性质

我们先讨论由水和某种不挥发性非电解质的溶质组成的二元

溶液，其存在着下列四种依数性质：

（1）稀溶液中水的蒸汽压 $p_{水}$ 等于纯水的蒸汽压 $p^0_{水}$ 乘以溶液中水的摩尔分数 $X_{水}$；或者可以说，溶液中水的蒸汽压的降低值 $p^0_{水}-p_{水}$ 等于纯水的蒸汽压 $p^0_{水}$ 乘以溶质的摩尔分数 X_s，即

$$p^0_{水}-p_{水}=p^0_{水}X_s \tag{3-12}$$

这个关系被称为拉乌尔定律(Raoult's Law)。

（2）在相同的外压下，稀溶液的沸点 T_b 要高于纯水的沸点 T^0_b，其沸点升高值(boiling-point elevation)正比于溶液的质量摩尔浓度 m_s，即

$$\Delta T_b=T_b-T^0_b=K_b m_s \tag{3-13}$$

$$K_b=RM_{水}(T^0_b)/r \tag{3-14}$$

式中，K_b 称为沸点升高常数(ebullioscopic constant)；气体常数 $R=8.314\text{J/(K·mol)}$；r、$M_{水}$、T_b 分别是纯水的摩尔蒸汽热、摩尔质量和沸点。$M_{水}=18.1\ \text{g/mol}$；当 $T_b=373.15\text{K}$ 时，$r=539.0\ \text{kcal/kg}=40.6\text{kJ/mol}$，可求得 $K_b=0.51\text{K(kg/mol)}$。

（3）在相同的外压下，当温度降低时，若水和溶质不生成固溶体，而且生成的固态不是纯冰，则稀溶液中水的冰点 T_f 要低于纯水的冰点 T^0_f，其冰点的降低值(freezing point depression)正比于溶液的质量摩尔数，即

$$\Delta T_f=T^0_f-T_f=K_f\cdot m_s \tag{3-15}$$

$$K_f=RM_{水}(T^0_f)^2/L_f \tag{3-16}$$

式中，K_f 称为凝固点降低常数(Cryoscopic constant)；L_f 为冰在 T^0_f 温度下的摩尔融化热。当 $T^0_f=273.15\text{K}$ 时，$L_f=6.003\text{kJ/mol}$，可得出 $K_f=1.86\text{K(kg/mol)}$。

稀溶液的上述性质，包括后面将要讨论的渗透压，称为稀溶液的依数性质(colligative properties)。当溶剂的种类和数量确定后，这些性质只取决于所含溶质分子的数目，而与溶质的本性无关。

（三）实际水溶液的冰点降低性质

对于理想的由非电解质溶质构成的稀溶液，实验已表明其冰

点降低正比于溶液的质量摩尔浓度 m_s，即式(3－15)。若溶质是电解质，它可能部分或全部离解成正、负离子团。离解后，正离子团、负离子团以及未离解的分子，均能以相当于理想非电解质溶质分子那样的方式，对溶液的冰点降低起作用。

对于溶液的非理想性对蒸汽压的影响，常用活度(activity)和活度系数(activity coefficient)来考虑。

对于非理想溶液的冰点降低的影响，许多人习惯用渗摩尔浓度(osmolality)来表示，即使对非理想的电解质溶液，也直接运用下式表示冰点下降的性质

$$\Delta T_f = K_f \Omega \qquad (3-17)$$

这里，K_f 与式(3－15)相同；而 Ω 是质量渗摩尔浓度(osmolality)。非理想溶液的渗摩尔数(osmol)数值上等于能起到相同 ΔT_f 效果的理想稀溶液中的质量摩尔浓度。而 Ω 与溶液的实际 M_s 之比，被称为渗透系数(osmotic coefficient)。

三、二元溶液的冻结特性

现以含 NaCl 的水溶液为例，说明冻结过程中溶液的温度和浓度变化关系。图 3－5 示出的是 $NaCl+H_2O$ 二元溶液相图的左半部分(即低浓度部分)，A 点代表在一个物理气压下纯水的冰点，即 273.15K；E 是共熔点(eutectic point)，是液相和二种固相的三相共存点；曲线 AE 就反映了溶液的冰点降低的性质。现在来看溶液的冻结曲线。设溶液的初始浓度为 W_1，由室温 T_m 开始被冷却，在液相区，其温度降低，但浓度不变，即沿垂直线 a_1b_1 下行。当温度降到 T_{b1} 时($T_{b1}<T_A$，其差值取决于溶液的初始质量摩尔浓度)，溶液中开始析出固相的冰，从此体系的物系点就进入了 ABE 的固液两相共存区。固相冰的状态用 AB 线(浓度为0)上的点来表示，如 b_1 点的冰点温度就是 T_{b1}；液相的状态由 AE 线上的点表示。对两相共存的体系进行降温，由于固相冰的不断析出，使剩余的液相溶液的浓度不断提高，冰点不断降低，直至共熔点 E 后，全部剩余的液相成固态，成为共熔体。

若在室温 T_m 下，溶液的初始浓度由 W_1 提高到 W_2，则溶液

中液相部分的状态变化就沿着 a_2b_2E 的曲线进行。

上述讨论的是在一般的降温速率时所发生的平均冻结情况。如果初始浓度较大，且降温速率极高，溶液来不及析出冰，溶液温度被降至低于 T_b，甚至低于 T_E，就会使全部溶液非晶态固化。我们将在§3.5详细讨论这个问题。

溶液和生物样品被冷冻到任一温度时，未冻水份额的估算可按下列方法进行：

由图3-5或冰点降低公式(3-15)、(3-17)可以看出，当溶液被冷却至低于冰点的任一温度时，其液相部分的质量摩尔浓度 m_s，或质量渗摩尔浓度是可以求得的，再根据溶液未冻前的初始浓度的值，就可以求得此时未冻水的份额。

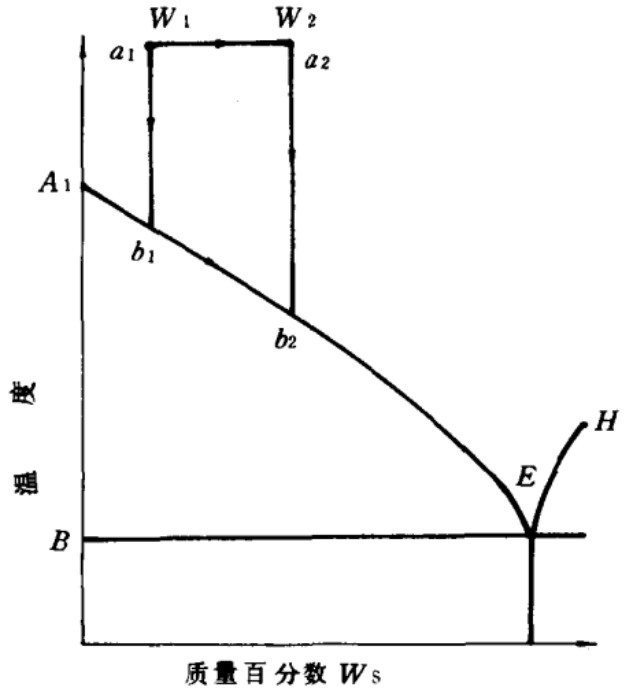


图3-5 NaCl水溶液的冻结曲线

图3-6示出两种计算曲线，曲线 A 是对初始浓度为300milliosmolar的溶液(即相当于 $m_s=0.3\text{mol}/\text{kg}_{水}$ 的理想稀溶液)，对应的是人的红细胞的情况；曲线 B 是对初始浓度为

20milliosmolar 的溶液(即相当于 $m_s = 0.02 mol/kg_{总}$ 的理想稀溶液),对应的是海藻细胞的情况。

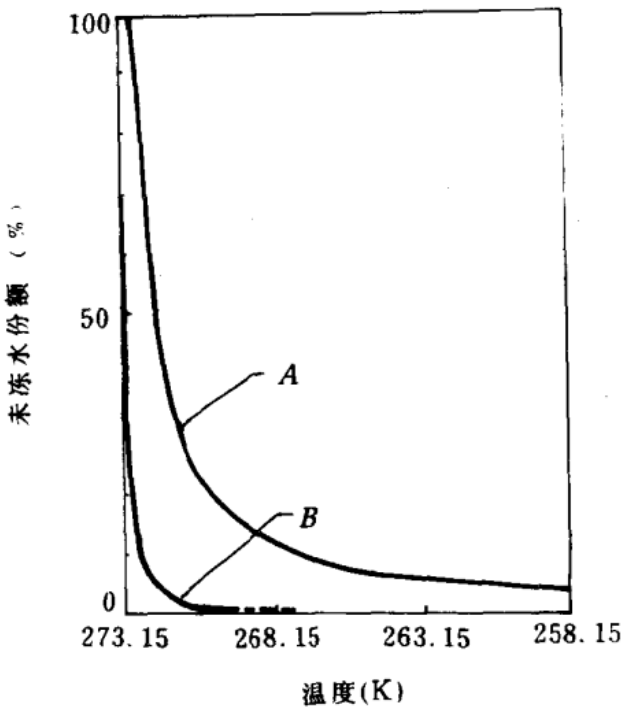


图 3-6 溶液中未冻水的份额与温度和初始浓度的关系

降至某一温度时,未冻水的份额与溶液的初始浓度有较大的关系,高的初始浓度能获得较大的未冻水份额。对于生物样品,初始浓度一般都很低,因此在稍低于 0℃的情况下,已使绝大部分水冻结成冰。例如,当温度降至 -5℃时,海藻细胞内的未冻水份额已小于 1%;红细胞内未冻水份额也只有 10%左右。

四、融化过程的特点

融化过程的作用是将已冻结的细胞、组织复温,力求使之恢复到原先未冻结前的状态。虽然它是冻结过程的反过程,但融化过程的温度控制却比冻结过程要困难得多,也很难达到高的复温速率。

融化过程的操作,一般是将被冻结的组织或样品放在水槽中,控制槽的温度、供热速率,从而控制样品的融化过程。在融化过程中,样品的外层首先被融化,供热过程必须先通过这个液体层;而

在冻结过程中，样品外层首先被冻结，吸热过程通过的是这个冻结层。表3－1列出冰和水的某些热物理数据，冰的比热只有水的一半，导热系数却为水的4倍，而导温系数却为水的8.6倍。因此，冻结过程的传热条件要比融化过程好得多，在融化过程中，很难达到高的复温速率。

表3－1　　水和冰的某些热物性的比较

	密度 (kg/m^3)	比热 [J/(kg·K)]	导热系数 [W/(m·K)]	导温系数 (m^2/s)
冰	917	2120	224	11.5×10^{-7}
水	999.87	4217.7	0.561	1.33×10^{-7}

此外，在冻结过程中，人们可以将槽温降得很低，以增大它与样品的温度差来加强传热，提高冷却速率。可是在融化过程中，槽温却受到生物样品的限制，一般不得高于36～42℃，否则将导致细胞死亡。所以，融化过程的热控制要比冻结过程更为困难。

用微波技术进行冻结材料的复温也是人们曾经试过的一种方法，它的加热是内部加热，可望得到较高的复温速率和较均匀的温度分布。但它也有自己的问题。如微波功率透经冻结样品时的剧烈的衰减、活细胞对最高温度的限制、微波场内样品温度的测量和微波功率的控制等。目前，微波用于低温保存的生物体的复温并不多见。

五、冻结和融化过程中的渗透现象

在一般情况下，无论在体内或体外，细胞内溶液的浓度总要和细胞外溶液的浓度基本相同，即保持内外等渗的条件。但在冻结过程中，当胞外溶液中的水分开始冻结成冰，胞外液相溶液的浓度升高，高于胞内溶液的浓度。此时胞内水分就向胞外渗透，达到新平衡的趋势。这一渗透过程使溶液浓度增大、细胞体积缩小。

假定细胞膜是一种可让水分子自由通过，而不允许溶质分子通过的半透膜，当膜内外存在浓度差时，就要产生水分子通过细胞膜的渗透。对此情况，我们可以在浓度高的一侧增大压力，以使两

侧的化学势相等而达到平衡，阻止渗透。当膜一侧为溶液、另一侧为纯水时，加在溶液侧的这个额外的压力就被定义为溶质的渗透压 Π(osmotic pressure)。因此，只要浓度不为零，渗透压总是存在的，浓度越高，渗透压越大。

对于理想稀溶液，渗透压也是一个依数性质，可以证明渗透压为

$$\Pi = RTX_s / V_{水}^0 \tag{3-18}$$

式中，$V_{水}^0$ 是纯水的摩尔体积，约为 18×10^{-3}/mol；气体常数 $R=8.314$J/(K·mol)；T 为绝对温度，K；X_s 为溶质的摩尔分数浓度。

按定义，$X_s = n_s/(n_s + n_{水})$；对稀溶液，可以近似为 $X_s = n_s/n_{水}$，而 $n_{水}\cdot V_{水}^0$ 就是溶液中水的体积 V，这样式(3-18)可以改写成

$$\Pi V_{水} = n_s \cdot RT \tag{3-19}$$

这个关系式被称为 Van't Haff 方程。它和理想气体的状态方程式具有完全相同的形式。渗透压是状态参数。

由于 $m_s = n_s/\text{kg}_{水}$，所以式(3-19)可以改写成

$$\Pi = K_{os} m_s \tag{3-20}$$

即渗透压正比于溶质的质量摩尔浓度 m_s。K_{os}称为渗透压常数(osmotic pressure constant)。对于 37℃的水，

$$K_{os} = 25.4\text{atm/molality} = 2.54\times10^6\text{Pa/molality}$$

这意味着只要有很少量的溶质，就能使溶液具有很高的渗透压力。

在单位时间内，由细胞膜的单位面积上渗透出来的水流率 $J_{水}$ 可以表示为

$$J_{水} = p_{水}(\Pi^c - \Pi^i) \tag{3-21}$$

式中，Π^c、Π^i 分别为膜外和膜内的渗透压；$p_{水}$ 是细胞膜的水渗透率(water permeability of cell membrame)，是个唯象系数，常用单位是 $\mu m^3/(\mu m^2\cdot\text{min}\cdot\text{atm})$。

水渗透所引起的细胞内水量减少和细胞体积的降低可表达为

$$J_{水} = -(1/A)(dp_{水}/dt) = -(1/A)(dV_{胞}/dt) \tag{3-22}$$

式中，A 代表细胞的表面积；t 代表时间。

联立上述两式，即得

$$dV_{胞}/dt = p_{水} A(\Pi^{i} - \Pi^{e}) \qquad (3-23)$$

此式可以用来反映在冻结过程中，由于胞外冰的形成和增多，使胞内外渗透压不同，从而引起细胞体积变化的情况。

§3.3 低温保护剂和保存液

除了极简单的病毒、细菌等外，一般的生物体在没有添加抗冻剂的情况下经历低温后是很难存活下来的。所以，生物体的低温保存是离不开抗冻剂的。合理地选择低温保护剂(cryoprotective agent，CPA)和配制合适的保存液，对低温保存至关重要。

一、低温保护剂(抗冻剂)

到目前为止，人们发现的抗冻剂不下数十种。按其是否能渗透到细胞内，可将抗冻剂分为渗透型和非渗透型两种。

(一) 渗透型抗冻剂

常用的渗透型抗冻剂有甘油、二甲亚砜(DMSO)、乙二醇(EG)、乙酰胺、丙二醇(PG)等。此类抗冻剂多属低分子中性物质，在溶液中易结合水分子，发生水合作用，使溶液的粘性增加，从而弱化了水的结晶过程，达到了保护的目的。但其使用浓度、渗入细胞的能力、对水分子活性的影响等各不相同，如甘油适于慢速冷却用，而 DMSO 却易于渗入细胞，并在常温下稍有毒性。冷却时加入此类抗冻剂，将发生如下变化：①冲淡溶液中溶质(盐)浓度，细胞摄入盐量减少，由抗冻剂替代；②抗冻剂进入细胞，改变了胞内过冷状态，使胞内压接近胞外压，降低了细胞脱水皱缩程度和速度；③抗冻剂进出细胞容易，缓解了水浴复温时渗透性肿胀引起的损伤。

(二) 非渗透型抗冻剂

常用的非渗透型抗冻剂有聚乙烯吡咯烷酮(polyvingyl pyrollidone，PVP)、蔗糖(sucrose)、葡聚糖(右旋糖酐，dextrane)、聚乙二

醇(polyethylene glycol,PEG)、白蛋白(albumin)、羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch, HES)等。这类物质能溶于水,但不能进入细胞,它使溶液呈过冷状态,即可在特定温度下降低溶质(电解质)浓度,从而起到保护作用。慢速冷却时,蔗糖可降低胞外溶液的溶质浓度,减少了阳离子进入细胞的数量;快速冷却时,由于抗冻液中有蔗糖,胞内水分已部分渗出,缓解了胞内结冰情况。所以,此类抗冻剂对快速、慢速冷却均有保护效果。

此外,高分子抗冻剂如聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖、白蛋白等由于分子量大,克分子浓度低,对溶剂的活性作用就很小。如 PVP,慢速冷却时,它能降低溶液中低分子溶质(电解质)浓度,减轻盐害;快速冷却时,由于克分子浓度低,对细胞脱水影响小,不改变胞内结冰状况,因而快冻时无保护作用。

实际上,由于单一抗冻剂各有优缺点,不能满足生物材料的冷冻保存的多方面要求,所以抗冻剂一般都是按一定配方混合使用的,以取长补短。如 VS1 由 20.5% (*W*/*V*)DMSO、15.5%(*W*/*V*)乙酰胺、10%(*W*/*V*) 1,2-丙二醇、6%(*W*/*V*)聚乙二醇和改良的 Dulbecco 盐溶液组成。

二、保存液

为了保持离体细胞、组织和器官的活力,延长其寿命,提供其所需的营养和生活环境,人们模拟其体液或胞内液,配制了各种各样的保存液。此外,在低温冷冻前的预处理中,还常常用保存液稀释抗冻剂,形成所需的抗冻液浓度。所以保存液的配制,以及所需注意的事项,也是人们关心的问题之一。

(一) 保存液的组成

保存液的组成,因各种细胞、组织和器官的特点而不同,但仍可分为以下几种:

① 电解质平衡盐溶液,包括仿胞内型溶液和仿胞外型溶液。这些溶液中含有不同的 NaCl、KCl、$MgSO_4$、$CaCl_2$、$NaHCO_3$、KH_2PO_4 等,典型的有 Ringer's、Hank's、Earle's 等配方。

② 高渗溶液,一般选用葡萄糖、甘露醇、蔗糖等作为高渗剂。

这种溶液用于慢冻预处理，可降低盐浓度；用于快冻预处理，使细胞脱水，从而可缓解胞内结冰的不利情况。

③ 营养液，含有多种营养物质如氨基酸、核苷类、葡萄糖等，常用的有 TC199、1640、Earles、Hams F_{12} 等溶液。

此外，为了防止细菌繁殖，有时需添加抗生素，如青霉素、链霉素、卡那霉素、庆大霉素或某几种的混合物。

（二）配制保存液时的注意事项

如上所述，配制保存液的目的是给离体细胞、组织和器官提供一个富有营养的适宜环境，所以配制时应注意以下几点：

（1）溶液的等渗度　保存液不一定等渗，但应接近等渗，使细胞膜两侧的渗透压相同或相近，以有利于保护细胞的正常结构不受损害。

（2）溶液的 pH　虽然有机体和细胞可经受其外环境 pH 较大的变化，但细胞内的代谢对 pH 却很敏感。大多数细胞内的代谢发生在 pH 接近中性的条件下，此时各种生化代谢、反应代谢、反应速度最大。

（3）抗凝剂　分化学药品和生物制剂两种。化学药品抗凝剂多采用钙结合剂，如 EDTA－Na_2 的结合力很强，每 500ml 全血用 1.36% 的 EDTA－Na_2 溶液 30ml 即可；而枸橼酸纳与钙的结合力较弱，每 500ml 全血需 2～3g。化学药品抗凝剂主要用于红细胞和骨髓细胞的保存。生物制剂常用的是肝素，为一种酸性粘多糖。它是通过阻止凝血酶的生成而达到抗凝目的，10mg 可使 100ml 血液数天不凝固，它主要用于白细胞和血小板的分离和保存，其缺点是抗凝能力有一定的时间限制。

§3.4　三元溶液的相图及其在低温生物学中的应用

一、二元系统的固液平衡相图

关于相平衡的 Gibbs 相律给出

$$f = 2 + C - P \qquad (3-24)$$

式中，f 为系统的自由度数；C 为系统的组分；P 为系统的相数。

在研究固液平衡系统时，如果外压大于系统的蒸汽压，蒸汽相就不复存在。这种只有固相、液相而没有气相的系统，称之为凝聚系统。对于由二个组分组成的凝聚系统，在二相平衡时，只有二个自由度。在通常的压力范围内，压力对凝聚系统的影响甚微，故一般只需研究常压下的温度-浓度的平衡相图。溶液在冷却过程中可以得到一种或多种固相，它们在成分上是不同的，而且绝大多数固相之间是不相溶的。

固液平衡相图是通过实验方法测得的。测量冷却固化过程或复温融化过程中温度随时间变化的曲线，观察是否有新的相出现。常用的测量方法是差热分析术 DTA(differential thermal analvsis)和差示扫描量热术 DSC(differential scanning calorimetry)。

二元溶液的相图，有的较为简单，可分为下列几种基本类型：

① 生成简单的低共溶混合物。

② 二种组分可能生成一种新的化合物，这种化合物的化学组成不随温度和压力变化。

③ 生成固溶体 (solid solutions)。

低温生物学中常用的二元溶液的相图，有的相当复杂，但是也不外乎由上述几种简单类型的相图拼接而成。图 3－7 给出了 NaCl-H_2O的相图。

现以 NaCl-H_2O 系统加以说明。在生物、医学中常用的“生理盐水”是含 0.85%～0.9% NaCl 的溶液，以使其渗透压和人或哺乳类动物的血浆的渗透压相近。对于 0.85%的盐水溶液，其冰点约为－0.55℃。若盐水溶液的初始浓度＜22.4%，此溶液被冷却到一定温度时开始析出固相的冰，这一温度被称为溶液的冰点(图中的 N 点)。随着溶液浓度的增加，溶液的冰点将降低。

由于冰中氢键的特点，冰对溶质材料几乎没有固体可溶性，亦即固相中只有纯冰，而没有 Na；而液相中的 NaCl 浓度将增加，随着温度降低而沿着图 3－7 中线 NB 变化。当系统冷却到点 O(其

相应的温度为 -21.2℃，被称为盐水溶液的共晶温度），此时液相的状态已到 B 点（相应的质量分数为 22.4%）；当温度低于共晶温度后，系统中就开始出现第二种固相 $NaCl \cdot 2H_2O$，并和冰共存。温度为 -21.2℃、浓度为 22.4% 的状态称为盐水溶液的共晶点。如果溶液的初始浓度大于 22.4%，当溶液冷却时，首先析出的固相就不再是冰，而是 $NaCl \cdot 2H_2O$ 或 NaCl。

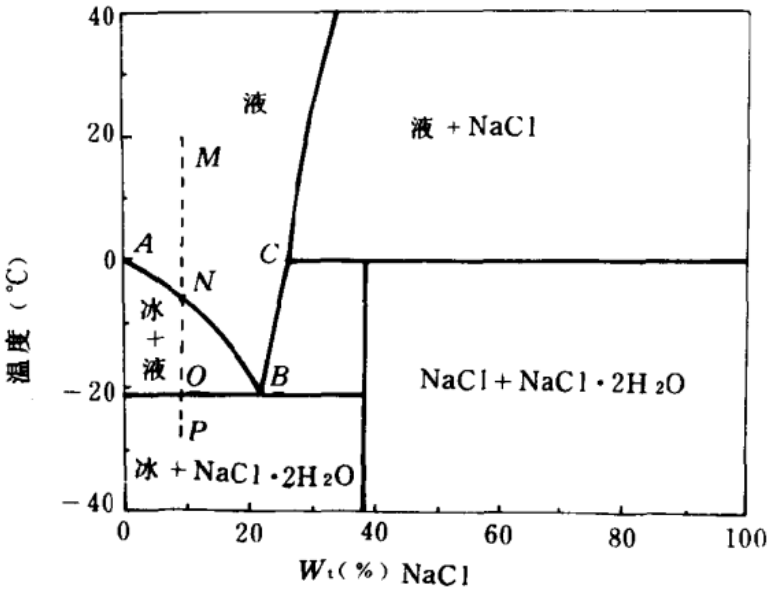


图 3-7　$NaCl-H_2O$ 二元系统的相图

二、三元系统的固液相平衡

图 3-8 给出三元溶液固液平衡的三维相空间的示意图。这个相空间是一个底面为等边三角形的直柱体，其垂直坐标为温度。底面三角形的三个顶点分别代表三个纯的组分，如 A 为 100% 的 NaCl，B 为 100% 的 CPA，C 为 100% 的 H_2O。由 $NaCl-H_2O$ 二元系统的相图（图 3-7）可以看出，估计低温生物学应用的实际三元溶液的相图比所示的要复杂得多，而且三元溶液中还会出现许多在二元溶液中难以预料的相效应。在这里，我们仅利用图 3-8 来形象地说明一些基本关系，而且根据低温生物学目前研究的需要，我们只讨论含 H_2O 量较高的区域（富水区），亦即近 C 点的情况。在图 3-8 中，我们假设三个固相之间是互相不相溶的。实际情况

也是这样，在 CPA-NaCl-H_2O 三元系统中出现的多种固相都是互不相溶或极少相溶的。

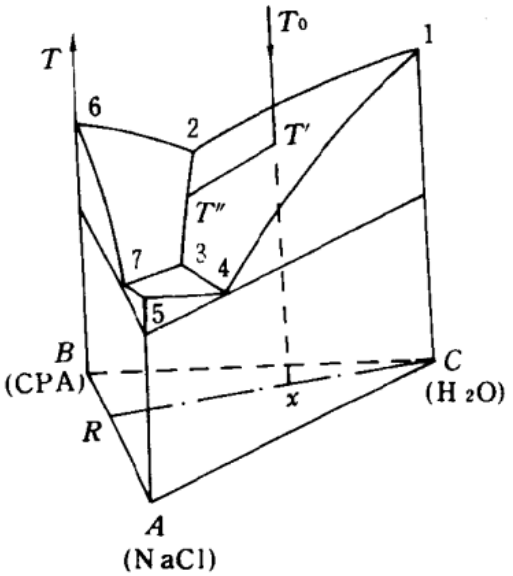


图 3－8　CPA-NaCl-H_2O 系统的固液平衡相空间的示意图

现在我们来讨论图 3－9 中相平衡面所对应的温度和组分之间的关系。对于三组分系统，根据相律自由度 $f=5-P$，实际已证明，只要压力不是太高或太低，压力的影响是很小的，所以在常压附近 $f=4-P$。

在全液相区，$P=1$，$f=3$，即有三个自由度，它们可以是温度 T 和两个组分的浓度，如 W_1 和 W_2。在液固两相平衡区，$P=2$，$f=2$，即有两个自由度。它们可以是温度 T 和某一组分的浓度。这种两相共存的表面，如图中的曲面 1234、2673、3754 等，被称为一重饱和表面(surface of onefold saturation)。图中的线 23 是液相和两个固相共存的状态($f=1$)，被称为二重饱和线(line of twofold saturation)。同样，线 34、线 37 也都是二重饱和线。而在点 3，液相和三个固相相平衡 ($f=0$)。

此图也示出了溶液冷却时其组分随温度的变化情况。设溶液的初始温度为 T_0，初始浓度为 W_n^0，W_h^0 和 W_c^0 分别代表 NaCl、

H_2O 和 CPA 的质量分数浓度，显然存在着关系 $W_n^0 + W_h^0 + W_c^0 = 1$。当温度降至 T' 时，开始出现第一种固相(冰)；然后沿着一重饱和面 1234 降至 T''，在此点上和二重饱和线 23 相交，出现第二种固相；再沿着二重饱和线 23 降至 3，在此点上出现第三种固相。

曲线 $T'T''$ 有其特殊的变化规律，因为在一重饱和面 1234 上析出的固相只含冰而不含其他组分，因此在由 T' 降至 T'' 的过程中，虽然未冻液相中的 CPA 和 NaCl 的浓度都在增加，但它们的比例却保持不变，我们令其为 R，即

$$R = W_{CPA}/W_{NaCl} = \text{const.} \qquad (3-25)$$

从底面三角形 ABC 来看，降温曲线 $T'T''$ 的投影必然在线段 CXR 上，其组分的浓度很容易由底面三角形来确定。这个三角形又被称为浓度三角形，只要知道某状态在此三角形的投影 P，由点 P 作三条与三边平行的线，就可以在各边上读出各组分的浓度。图 3-9 给出浓度三角形图，其三个顶点分别代表三种纯组分，而在它的边上均匀地分度该组分的浓度。

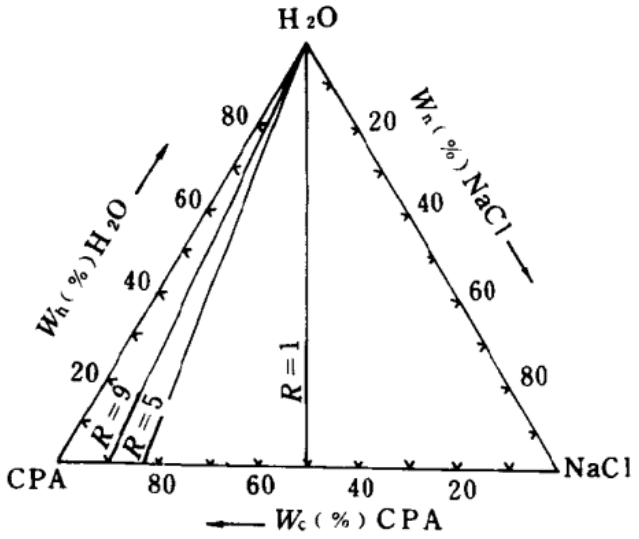


图 3-9　三元系统的浓度三角形

三、三元系统富水区的平面图

和二元系统一样，三元系统的相图也是利用DTA或DSC通

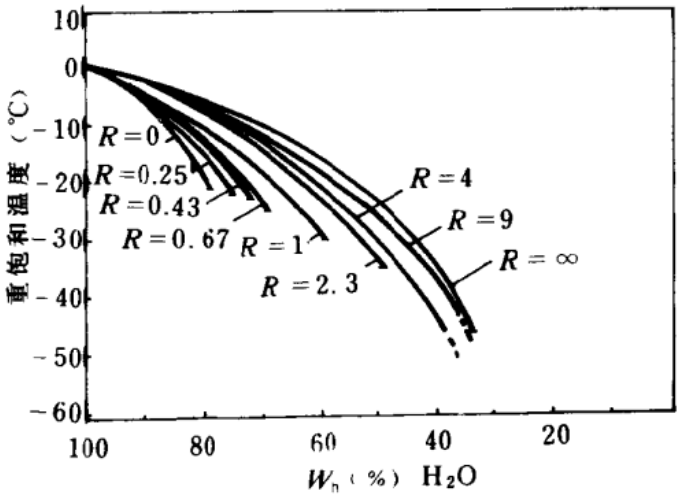


图 3－10　甘油-NaCl-H_2O 系统一重饱和面的平面相图

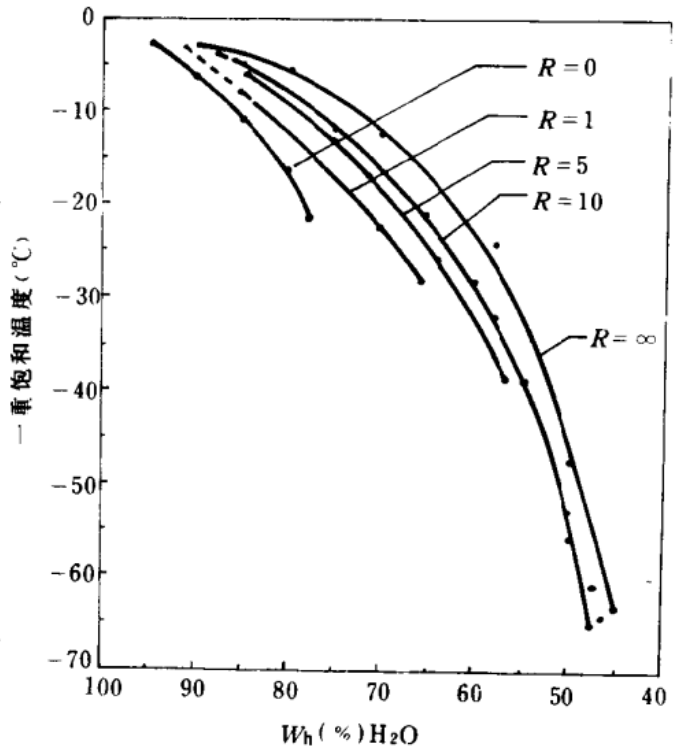


图 3－11　DMSO-NaCl-H_2O 系统一重饱和面的平面相图

过试验而获得的。70 年代中期，美国 Duke 大学工学院 Cocks 教授指导的两名博士生 Goldston 和 Hildebrandt 分别对甘油-H_2O 和 DMSO-NaCl-H_2O 的一重饱和温度和玻璃化转变温度进行了实验测定。试验的基本方法是先将溶液试样从室温快速冷却(25℃/min)降至 -196℃，然后以 5℃/min 的速率复温到 +25℃，测量复温过程中的放热-吸热曲线，由曲线的峰值、谷值等计算出各种相变所对应的温度。

在低温生物学中，人们目前最关心的是富水区一重饱和面上的变化。为了便于分析和使用，人们将发生一重饱和时的温度和各组分浓度的关系，绘在平面图上，构成一重饱和面的平面相图，如图 3-10 和图 3-11 所示。在此两图中，纵坐标是一重饱和温度，即溶液中开始出现冰的温度；横坐标是 H_2O 的含量 W_h；而以 CPA 浓度与 NaCl 浓度之比 R 作为参变量。根据 T 和 R，可以查得溶液中水的质量份数 W_h。而知道了 W_h 和 R，就可方便地计算出 W_c 和 W_n。

四、一重饱和温度的计算

80年代，PeggD. E. 将上述实验数据整理成近似的计算公式。

(1)对于甘油-NaCl-H_2O 三元系统，一重饱和温度 T 和溶质的总浓度 W_T 以及 R 之间的关系为：

$$T = A(100W_T) + B(100W_T)^2 \qquad (3-26)$$

式中 $A = (-1.6 - 1.27R - 0.25R^2)^{-1}$；

$B = 0.01$；

$W_T = W_N + W_G = 1 - W_H$；

$R = W_G / W_N$。

(2) 对于二甲亚砜(DMSO)-NaCl-H_2O 三元系统，一重饱和温度 T 和溶质的总浓度 W_T 以及 R 之间的关系为：

$$T = A(100W_T) + B(100W_T)^2 + C(100W_T)^3 \qquad (3-27)$$

式中 $A = -0.6 + 0.17\mathrm{arctg}(R)$；

$$B = \frac{\mathrm{arctg}(R/2)}{132} - 0.01;$$

$C=-4.5\times10^{-4}$；

$W_T=W_N+W_D=1-W_H$；

$R=W_D/W_N$。

根据式(3-26)和式(3-27)，我们可以进行两方面的计算：

①由溶液未冻前初态的 W_T^0 和 R，确定溶液开始出现冰相的温度 T；

②根据 W_T^0 和 R，可计算出溶液在冻结过程中被冷至某温度 T 时，未冻溶液中的 W_T，进而还可计算出未冻溶液的其他重要参数。

五、三元系统冻结过程中未冻液相的参数计算

溶液由 H_2O、CPA(甘油或二甲亚砜)和 NaCl 组成，这些组分的质量分数浓度分别为 W_H、W_C(W_G 或 W_D)、W_N，而溶质的总质量分数浓度为 W_T。这些参数之间存在下列关系式：

$$W_H+W_C+W_N=1 \tag{3-28}$$

$$W_C/W_N=R \tag{3-29}$$

$$W_T=W_C+W_N \tag{3-30}$$

$$W_N=W_T/(R+1) \tag{3-31}$$

有时我们希望用质量摩尔浓度 m_C 和 m_N，它们分别指 1000 克水中含 CPA 和 NaCl 的摩尔数。计算 m_C、m_N 可用下列公式：

$$m_c=\frac{W_c/M_c}{(1-W_N-W_c)}\times1000 \tag{3-32}$$

$$m_N=\frac{W_N/M_N}{(1-W_N-W_c)}\times1000 \tag{3-33}$$

式中 M_N 为 NaCl 的摩尔质量(58.44g/mol)；

M_C 为 CPA 的摩尔质量(对 DMSO，为 78.13 g/mol；对甘油，为 92.05g/mol)。

在固液两相平衡时，已冻固相部分和未冻相部分的质量份额分别为 f_S 和 f_L，显然

$$f_S+f_L=1 \tag{3-34}$$

根据两相平衡的杠杆原则，

$$f_L=\frac{W_H^s-W_H^0}{W_H^s-W_H^L}=\frac{W_N^s-W_N^0}{W_N^s-W_N^L}=\frac{W_C^s-W_C^0}{W_C^s-W_C^L} \tag{3-35}$$

式中，W_i^0 是冻结前溶液中某组分的浓度；而 W_i^s、W_i^L 分别是冻结过程中该组分在固相和液相中的浓度。

如前所述，在我们所讨论的问题中，固相中仅含有水，即 $W_H^S=1$，$W_C^S=0$，$W_C^S=0$。这样，

$$f_L=\frac{1-W_H^0}{1-W_H^L}=\frac{W_N^0}{W_N^L}=\frac{W_C^0}{W_C^L} \tag{3-36}$$

未冻水的份额被定义为：

$$\mu=\frac{\text{在固液两相平衡时未冻水的质量}}{\text{冻结前溶液中水的质量}} \tag{3-37}$$

可以得到：

$$\mu=\frac{f_L W_H^L}{W_H^0}=\left[\frac{1-W_H^0}{1-W_N^L}\right]\frac{W_H^L}{W_H^0} \tag{3-38}$$

若已知 W_T^0 和 R，未冻时溶液的各组分浓度 W_N^0、W_C^0 和 W_H^0 可利用式(3-31)、式(3-29)和式(3-28)求得；而利用平面相图或式(3-26)和式(3-27)，可以求得在某温度两相平衡时液相的 W_T^L。有了 W_T^L 和 R，同样可利用式(3-31)、式(3-29)和式(3-28)求得 W_N^L、W_C^L 和 W_H^L；进而又可用式(3-36)和式(3-38)求得未冻份额 f_L 和未冻水份额 μ。

§3.5 玻璃化保存与溶液的玻璃化

一、玻璃化低温保存方法

玻璃化(vitrification)是指液体转变为非晶态(玻璃态)的固化过程。它和常见的液体转变为晶体或部分结晶的固体的冻结(freezing)过程不同，玻璃态固体分子之间的关系和液态无明显变化，而一般的晶体分子之间的关系和液态相差甚远。

早在1937年，Luyet就指出玻璃化方法可作为冰冻保存生物体的一条途径。他认为，生命可归结于“原子和其他一些生命单元

的专门而异常的排列”，并且“轻微的排列位置的扰动就会破坏平衡从而导致死亡”，而结冰时的驱动力会破坏这种特殊的“排列”，这就是冰冻死亡的原因。玻璃化比冻结固化方法引起的结构变化要小，因而是一种较理想的低温保存途径。此后，他一直致力于使稀溶液快速冷却实现玻璃化的研究，到60年代末，他通过仪器设备证明了原先所获得的透明固体内仍含有球晶时，才放弃了这种实现玻璃化的研究，而逐渐转向用高浓度溶液实现玻璃化的研究。其间有几次，他曾发现用很高的浓度，即使冷却速率不是很高时也可实现玻璃化，但遗憾的是，他并没有将此应用于生物体的玻璃化低温保存。

使溶液玻璃化有两条途径：一条是极大地提高冷却速率；另一条是增加溶液浓度。将样品快速投入液氮，其降温速率一般只有10^3K/s，而若要使1μm的纯水滴实现玻璃化，其降温速率要求在10^7K/s以上。对稍大的水滴实现玻璃化更困难。在纯水中加入溶质，可降低玻璃化所需冷却速率。当抗冻剂溶液（如甘油、DMSO、丙二醇等）浓度为40%～60%（W/V）时，较容易形成玻璃态。但在室温下，这样高的浓度会对细胞产生剧烈的损伤。因此，玻璃化研究的重点，一是寻求容易实现玻璃化并且对细胞损害较小的溶液，二是设法提高冷却速率。

1978年，Skaer和Franks等在研究了用高分子聚合物（PVP、HES等）作为电镜生物样品制备的低温固定剂时，提出了在骤冷条件下可使细胞外实现玻璃化。同时，Boutron和Kaufmann开始了一系列有关冻结的细胞内外非晶态剩余溶液的性质的研究。他们提出，如果在很慢的冷却或加热速率下，溶液最终仍能保持完全的非晶态，那么所有细胞应该都能得到保护而免受冰晶损伤。James重新对Luyet的快速冷却方法作了改进后，用于血吸虫蚴体的低温保存研究，虽然形成的玻璃态并不稳定，而存活率却从最初的6%提高到47%。Ham等应用这一技术进行盘尾丝虫微丝蚴低温保存，其存活率高达79%。

1981年，Fahy首先明确地提出，用高浓度的低温保护剂溶

液，可在较慢的冷却速率以及高压条件下实现完全的玻璃化。以后又发展了一些所谓“玻璃化溶液”，使细胞、组织乃至器官等范围广泛的生物系统玻璃化低温保存成为可能。1985 年，Rall 和 Fahy 用这种玻璃化溶液使鼠胚胎玻璃化保存获得成功，是这种技术走向实用化的首次真正突破。

80 年代中期，用高浓度抗冻液玻璃化低温保存老鼠胚胎获得了成功。此后，人们利用这些溶液又实现了人体细胞、单核白细胞、鼠胰岛、鼠胚胎和牛胚胎等的低温保存。

二、溶液的玻璃化

自从 1981 年，Fahy 提出采用高浓度的低温保护剂溶液以较慢的冷却速率实现玻璃化的概念以来，许多玻璃化低温保存研究工作都集中在发展各种有效的“玻璃化溶液”。事实上，大部分低温保护剂都可用来作为玻璃化溶液，表 3-2 给出了常压下一些渗透性的低分子量保护剂的玻璃化所需浓度 C_v。一般，C_v 的范围

表 3-2　渗透性低温保护剂溶液的玻璃化所需浓度

低温保护剂	Q	m	M	%(W/V)
乙酰胺 (A)	4.1	23	10	61
乙二醇 (E)	3.3	18	8.9	55
1,3-丙二醇	3.1	17	7.5	57
二甲亚砜(D)	2.1	12	6.3	49
甘油	2.7	15	7.1	65
1,2-丙二醇 (P)	1.9	10	5.7	44
2,3-丁二醇	1.8	9.9	5.1	46
D+甲酰胺(2mol:1mol)	3.2	18	8.3	56
D+尿素(3g:1g)	3.1	17	8.1	59
D+乙酰胺(DA)(1mol:1mol)	2.7	15	7.7	53
DA+10%P(DAP_{10})	2.6	15	7.4	52
DA+P (1g:1g)	2.4	13	6.9	50
D+P (1g:1g)	2.0	11	6.0	46

注：Q 为每 10mol 水中含有的保护剂摩尔数；m 为重量摩尔浓度；M 为体积摩尔浓度；%(W/V)为体积百分浓度。

约为40%～60%(W/V)。对于许多生物系统来说,这样高的浓度是无法承受的,会产生毒性损伤。

把各种保护剂混合使用,对降低 C_v、减小毒性是有益的。各种渗透性保护剂的玻璃化形成能力、毒性以及对细胞的渗透能力都是不同的。甘油和乙二醇的毒性较小,但是 C_v 都较大,玻璃形成能力差;而1,2-丙二醇玻璃形成能力较大,但是浓度高于10%时,毒性很大。把1,2-丙二醇加入到甘油、乙二醇以及DMSO中,可以使后者的 C_v 分别降低,增强了玻璃形成能力而又没有毒性效应。

另外,保护剂混合后使用可能使单独使用时毒性得到部分中和抵消。例如,40%(W/V)的DMSO的毒性是22.8%DMSO+17.2%乙酰胺的近三倍。

使用非渗透性的高分子聚合物保护剂如PVP、PEG、HES等作为加入混合物的一部分,也可明显地使渗透性保护剂的 C_v 降低(表3-3)。由于细胞内包含了高浓度的蛋白质,同样也可降低细胞内玻璃化所需的渗透性保护剂的浓度。而细胞外通过加入非渗透性聚合物保护剂,使渗透性保护剂减少到最低值,这样胞内外既能达到玻璃化,又降低了渗透性保护剂的浓度,减少毒性。实验表明,非渗透性保护剂的浓度以6%(W/V)左右较适宜,更高的浓度对提高细胞存活率并无好处。

为了减少低温保护剂毒性,在使用时应尽可能在低温下进行处理操作,在高浓度下暴露的时间尽可能短,还应选择适当的载体溶液,并且使用一些特殊的低温保护剂的毒性中和剂。研究表明,DMSO作为生物学上可接受的玻璃化溶液的基本组分是很有希望的低温保护剂。其玻璃化形成能力相对较好,对细胞的渗透很快,低毒,而且有多种毒性中和剂可供应用。对它的生物学和药物学效应以及对肾组织的低温生物学效应作过广泛研究。

与其他多元醇溶液比较,在相同的浓度下,左旋或右旋-2,3-丁二醇具有更高的玻璃化形成倾向和更好的玻璃态稳定性。因此,这两种2,3-丁二醇的同分异构体是目前最有希望用作器官玻璃化低温保存的保护剂。2,3-丁二醇的另一种同分异构体是内消

旋-2,3-丁二醇,由于有稳定的水合物,它并不具有低温保护剂作用。然而纯的右旋或左旋-2,3-丁二醇是非常昂贵的。商业上很便宜、又可作为低温保护剂使用的是2,3-丁二醇(97%,D,L)。这是三种2,3-丁二醇同分异构体的混合物,其中包含了96.7%左旋和右旋同分异构体的外消旋混合物,3.1%的内消旋-2,3-丁二醇。实验表明,它对红细胞的玻璃化低温保存具有良好的低温保护作用,而且如果使用得当,对器官的毒性很小。

表3-3 添加非渗透剂的低温保护剂溶液玻璃化所需浓度

低温保护剂	Q	m	M	%(W/V)
加6%(W/V)PVP				
二甲亚砜(D)	2.1	11	5.9	46
D+乙酰胺(DT)(1mol:1mol)	2.3	13	6.6	46
DA+10%P(DAP_{10})	2.3	13	6.6	460
6%HES+DA	2.6	14	7.3	50
6%HES+DAP_{10}	2.5	14	7.0	49
6%+蔗糖+DA	2.5	14	7.2	48
6%+蔗糖+DAP_{10}	2.4	13	6.9	47
6%PEG8000+甘油	~2.7	~15	~6.6	~61

注:PVP为聚乙烯吡咯烷酮K30;HES为羟乙基淀粉;PEG为聚乙二醇。

1985年,Rall和Fahy首次提出了一种有效的玻璃化溶液(VS1),其中包含了20.5%(W/V)DMSO(作为主要低温保护剂)、15.5%(W/V)乙酰胺(毒性中和剂)、10%(W/V)1,2-丙二醇(强化玻璃化形成能力)以及6%(W/V)聚乙二醇(PEG,分子量为8000的非渗透聚合物),以改型Dulbecco's盐溶液(HB1,pH8.0)作载体,并应用VS1成功地实现了鼠胚胎的玻璃化低温保存。这是应用高浓度玻璃化溶液慢速降温实现玻璃化的首次突破性进展。以后,还发展了VS2,所用的低温保护剂与VS1相同,只是基液采用含有3.2%(W/V)葡萄糖的RPS-2。此后,一系列应用玻璃化溶液VS1保存各种细胞、组织及胚胎的研究不断获得了成功。

第4章　低温生物学研究的低温工程技术基础

§4.1　低温技术基础

一、低温液体的性质

任何气体，如果所处的压力高于三相点(triple point)压力，能被冷却而液化；如果所处的压力低于三相点压力，则冷却而被直接固化，如图4-1所示。

在101325Pa(标准大气压)下，物质的气-液相变温温度被称为正常沸点(normal boiling point)或液化温度。所谓低温液体，一般是指正常沸点(或液化温度)很低的液相物质，如液氧、液氮、液氢、液氦等。

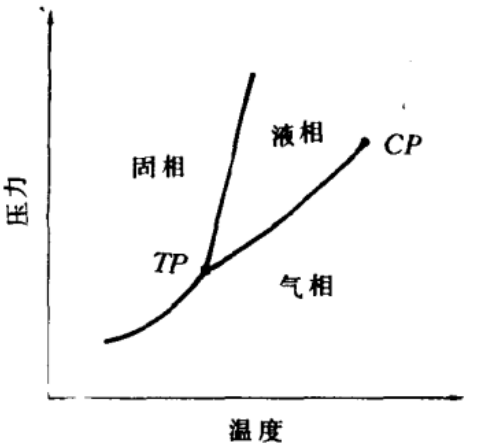


图4-1　物质的相图

在物质相图上，还有一个临界点(critical point, CP)，它表示气液相变的极限。如溶液高于临界温度 Tc，则无法通过加压使气体液化；如压力高于临界压力，则亦无法通过降温使之液化。表4-1给出了一些物质的正常沸点、汽化潜热、三相点、临界点等参数。

(一) 液氧

液氧和液氮主要是用空气的液化和分馏方法取得的。干燥净空气是混合物，主要由氮(体积百分率为78.09%，重量百分率为75.45%)、氧(体积百分率为20.95%，重量百分率为23.2%)组成，并含有微量的氦(He)、氖(Ne)、氪(Kr)、氩(Ar)、氙(Xe)、氢

(H_2)、臭氧(O_3)等。

表 4-1　　物质的某些物理参数

物质	正常沸点,(K)($p=101kPa$)	饱和液相密度 (kg/m^3)	汽化潜热 (kJ/kg)	三相点(*TP*)		临界压力(*CP*)	
				压力(kPa)	温度(K)	压力(kPa)	温度(K)
H_2O	373.15	958	2258	0.1674	273.16	22.1×10^3	647.3
CO_2	/	/	/	518.0	216.55	7380	304.2
O_2	90.2	1140	213	0.1520	54.4	5060	154.8
N_2	77.3	810	199	12.53	63.1	3383	126.2
H_2(正常氢)	20.4	70	451	7.18	14.0	1292	33.25
He	4.18	125	20.5	/	/	228.3	5.25

氧的原子序数为 8,原子量为 16。自然界的氧有三种稳定的同位素,它们的原子量分别为 16、17、18。其相对丰度(relative abundance)为 10000:4:20。氧气是无色的,但液氧和固氧却呈蓝色,这是由于在凝聚态中,氧分子可以有一种微弱的结合,构成聚合物 O_4 的缘故。液氧的正常沸点为 90.2K(-183℃),密度为 1140kg/m^3,比水稍重。液氧有很强的顺磁性。氧的化学活性很强,具有一定的危险性。

(二) 液氮

氮的原子序为 7,原子量 14.008,它由原子量分别为 14 和 15 的两种稳定的同位素组成,它们的相对丰度为 10000:38。在一般情况下,这两种同位素很难分离。氮的化学性质相当不活跃,且无毒、不爆炸。液氮正常沸点为 77.3K(-196℃),密度为 810kg/m^3,比水稍轻。液氮是无色、透明的,是被广泛应用的安全、廉价的低温液体。

(三) 液氢

氢的原子序数为 1,原子量为 1.008。它由原子量分别为 1(氢 H)和 2(氘 D)两种稳定的同位素组成,它们的相对丰度为 6400:1。由于氢分子是双原子化合物,因此普通的氢实际上是 H_2 和 HD 分子的混合物,其比例为 3200:1。氢还有一个原子量为 3 的同位素氚(tritium),它是半衰期很短的放射性物质,在自然界中含量极微。

氢分子由两个氢原子组成(氘分子也是这样)。这两个原子核的自旋方向的同异,可形成两种不同的氢分子。若两原子核的自旋同向,形成正氢(ortho－hydrogen)分子。若两原子核的自旋反向,形成仲氢(para－hydrogen)分子。仲氢的导热系数和比热要比正氢的高。在常温下的正常氢(normal hydrogen)中,氢中正氢和仲氢的体积比例是75%和25%;但当温度降低时就会逐渐发生正－仲转化。例如,在20.4K的经长期平衡后的平衡氢(equilibrium hydrogen)中,正氢只占0.21%,而仲氢却占99.79%,即几乎全是仲氢($P-H_2$)。

正－仲转化在没有催化剂的情况下,进行得很慢,需几个小时。所以,将氢气液化得到的液氢,最初的组成是和正常氢十分相似的。

正常氢的沸点为20.4K(－252.8℃)。液氢的密度为70kg/m^3,仅为水的1/14,是最轻的液体。它是无色、无味的。氢单独存在时并不助燃;但若和氧气、空气混合时,极易因极小的火花而产生燃烧或爆炸。

(四)液氦

氦可以从空气分离中取得,但因其在空气中的含量极少,故提取的成本极高。天然气中的He含量较大,有百分之几,提取的成本较低。氦的原子序数为2,原子量为4.003。氦有He^4、He^3两种稳定的同位素。通常的氦气中,He^3的含量小于1×10^{-7},所以一般的氦均指He^4。液氦的沸点只有4.2K(－269℃),是很难液化的物质。液氦的密度为125kg/m^3,只有水的1/7.67。液氦是无色、无味、安全的液体,其汽化潜热为20.5kJ/kg,只相当于水的1/110。图4－2给出了He^4的相图。由此图可以看出,液氦具有两个于一般物质不同的特性:

(1)氦不具有固－液－气三相共存的三相点。在一般压力下,通过冷却降温并不能使液氦固化,即液氦可以在0K附近仍保持液体状态。如果要生成固态氦,必须要把压力提高到2500kPa以上。

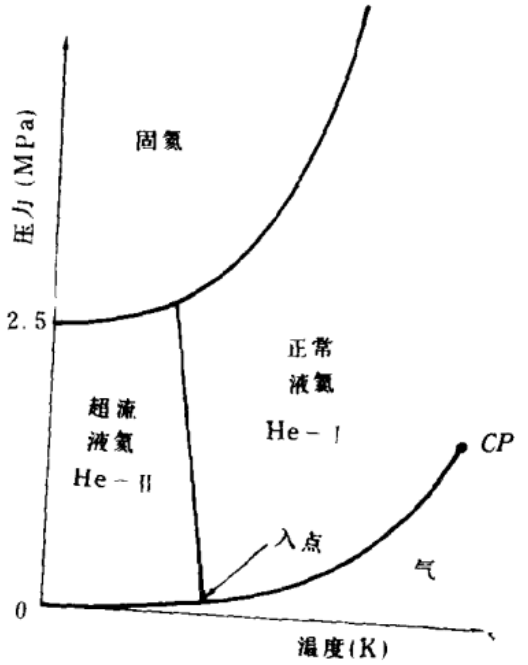


图 4－2　He^4 的相图

(2) 液氦被冷却到达 2K 以下时，产生两级相变，使正常液氦(He－I)转变为超流液氦(Superfluid Liquid Helium，He－Ⅱ)。图上的 λ 点(Lamda point)对应温度为 2.18K，压力为 5.02kPa。可以简单地认为，液氦具有两个液相：He－Ⅰ和 He－Ⅱ。He－Ⅱ具有极特殊的性质——超流性、第二声(second sound)等；而且 He－Ⅱ的导热系数也远大于 He－Ⅰ。

二、低温制冷的基本方法

要生产低温液体，就要通过制冷的方法吸走气体的潜热，使气体的温度降至沸点；再吸走汽化潜热，使气体液化。在液化气体的过程中，一般均采用该气体作为工质，而通过节流降温，或通过膨胀机作功降温，达到制冷的目的。

(一) 降温的基本方法

对于本书所讨论的温度、制冷量范围来讲，降温的基本方法有两种。

(1) 绝热节流效应　它又称 Joule－Thomson 效应，是让高压

气流绝热地通过节流阀降至低压。

绝热节流过程是等焓 h 的不可逆过程，会产生温度变化的效应，这就是 J.T 效应，可用焦耳－汤姆逊系数来表示，即

$$\mu_{JT}=(\delta T/\delta p)_h \tag{4-1}$$

若 $\mu_{JT}>0$，称为正效应，即通过 $\mu_{JT}>0$ 节流后，压力降低，温度亦降低；对于任何处于汽液两相区内的物质，因饱和温度随压力降低而降低，故 $\mu_{JT}>0$；对于处于常温下的 H_2、O_2 等，节流效应 μ_{JT} 亦大于 0；对于处于常温下的 N_2、He 等，节流效应 μ_{JT} 却小于 0，称为负效应，故不能直接利用绝热节流达到降温节流的目的。对于理想气体，$\mu_{JT}=0$。

(2) 绝热膨胀效应　所谓绝热膨胀，是让高压气体通过膨胀机进行膨胀，膨胀机对外做机械功，而气流的压力下降，温度亦降低。

可逆的绝热膨胀过程可称为等熵膨胀(isentropic expansion)。等熵膨胀总是能使气体温度降低的，即

$$\mu s=(\delta T/\delta p)_s>0 \tag{4-2}$$

(二) 液化氮气的两种基本循环

(1) 林德－汉普逊循环(Linde－Hampson Cycle)　这是一种仅利用绝热节流方法的简单循环，其循环简图和相应的温熵图如图 4－3 所示。

这种最简单的循环的液化率

$$\frac{m_f}{m}=\frac{(h_1-h_2)}{(h_1-h_f)} \tag{4-3}$$

其中，m 和 m_f 分别为循环流量与液化量；h_i 为各点的焓值。要利用此循环实现液化，就要求 $h_1>h_2$，在同一温度下，高压的焓值 h_2 应低于低压的焓值 h_2，即 J－T 效应应为正效应，因为 $\left[\frac{\delta h}{\delta P}\right]_T<0$。

$$m_{JT}=\left[\frac{\delta T}{\delta p}\right]_h=-\left[\frac{\delta T}{\delta h}\right]_p\cdot\left[\frac{\delta h}{\delta p}\right]_T=-\frac{1}{C_p}\cdot\left[\frac{\delta h}{\delta p}\right]_T \tag{4-4}$$

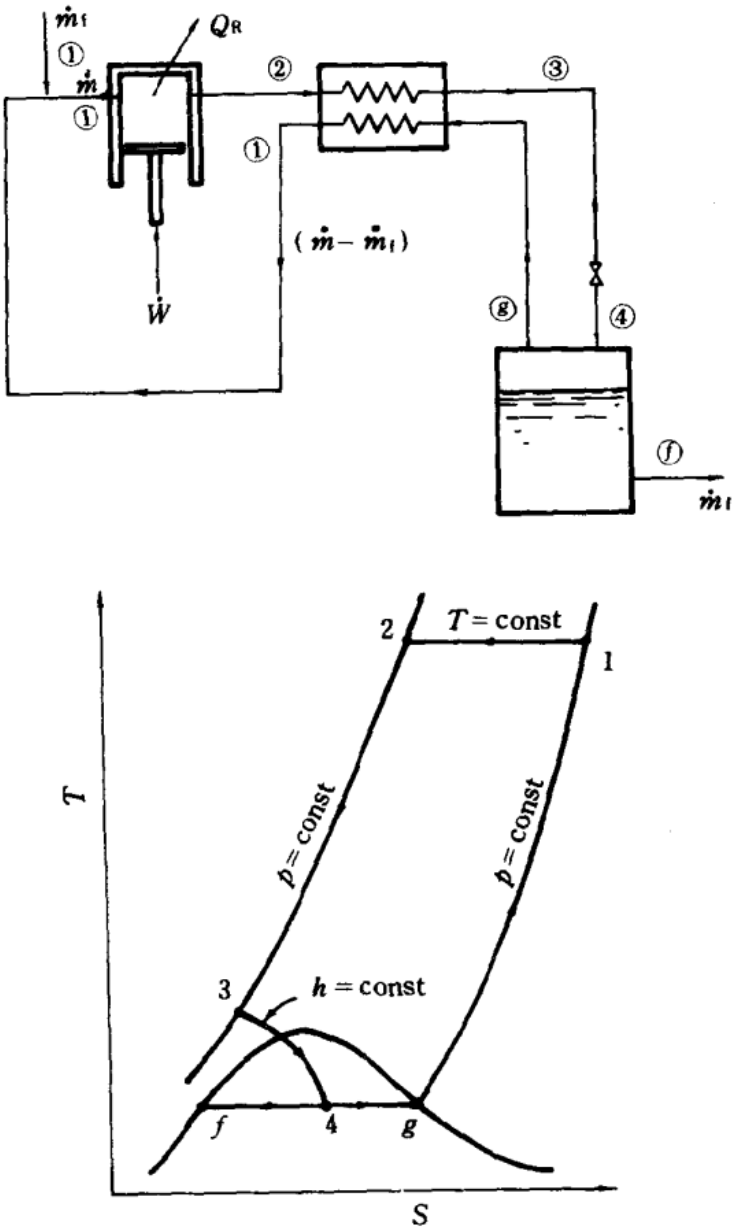


图 4－3　林德－汉普逊循环的系统图和温熵图

(2) 克劳德循环(Claude Cycle)　此循环中，既有膨胀机，又有节流阀。膨胀机主要用于气相区的降温吸热；而节流阀主要用于两相区的降温吸热。其系统图和 $T-S$ 图如图 4－4 所示。

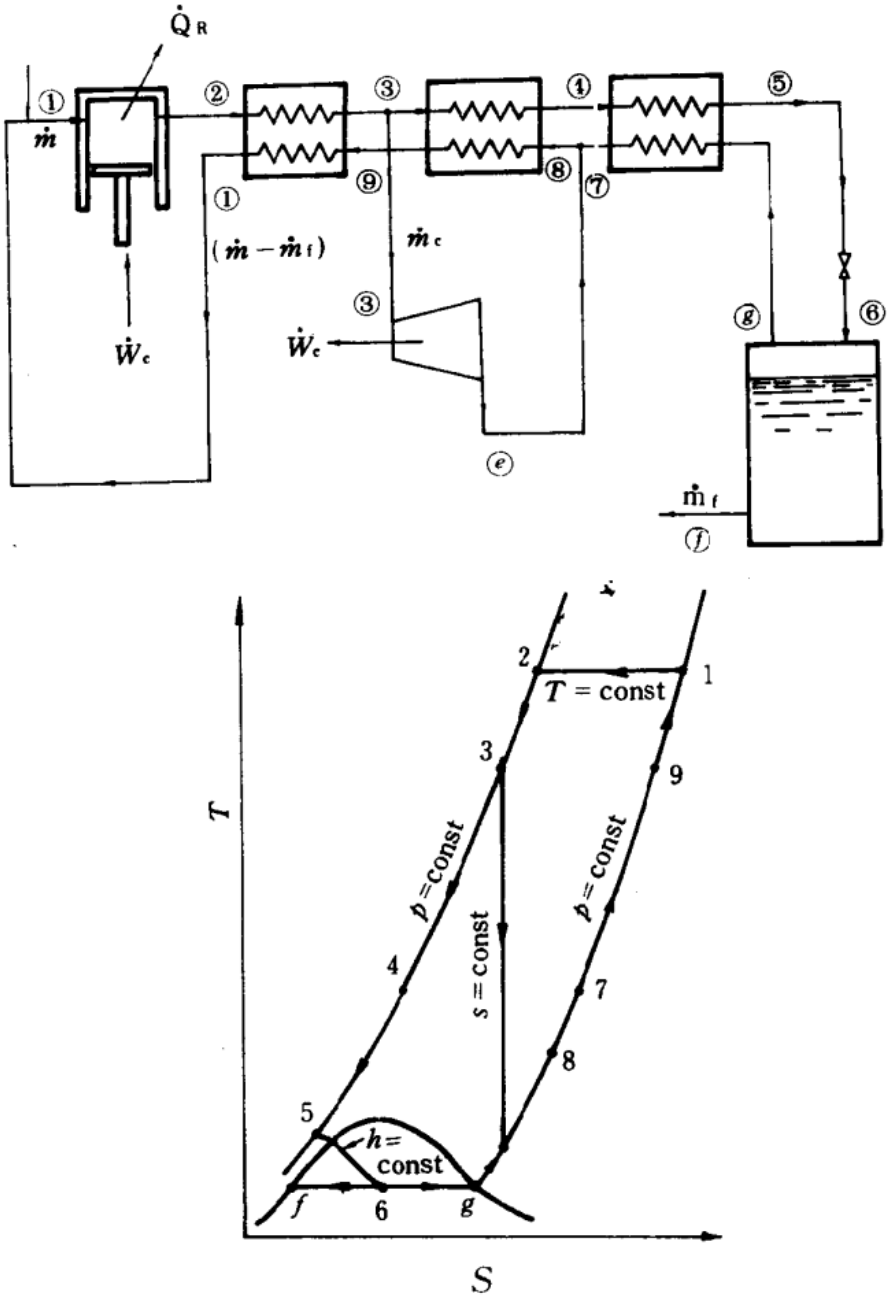


图 4－4　克劳德循环的系统图和温熵图

此循环的液化率

$$\frac{m_f}{m}=\frac{h_1-h_2}{h_1-h_f}+X\frac{h_3-h_c}{h_1-h_f} \tag{4-5}$$

此式右边的第一项是绝热节流的贡献；第二项是膨胀作功的贡献；而 X 是通过膨胀机的质量流份额，即 $X=\frac{m_c}{m}$。

（三）液化氢、氦的基本方法

H_2、He 的 J－T 正效应只能在低于 202K 和 40K 条件下产生，而处于常温下的 H_2、He 经绝热节流后不会产生降温效应，故不能用 Linda－Hamper 循环实现 H_2、He 的液化。解决这个问题有以下几个途径：

（1）先采用液氮等对氢气进行预冷，让后者的温度降至 J－T 效应的正效应区，再进行节流降温；而对于氦气，则要用液 H_2 来进行预冷，再进行绝热节流。

（2）采用绝热膨胀作功的办法降温，再配上绝热节流。

（3）上述方法的组合。

三、液氮的热物理性质

表 4－2　　固氮和液氮的饱和蒸汽压

温度(K)	压力(mmHg)	(Pa)
固氮 52	5.7	7.60×10^2
56	17.6	2.35×10^3
60	47.2	6.29×10^3
液氮 64	109.4	1.46×10^4
68	212.6	2.84×10^4
72	382.5	5.10×10^4
76	643	8.58×10^4
80	1019	1.36×10^5
84	1539	2.05×10^5
88	2255	3.01×10^5
92	3194	4.26×10^5
96	4377	5.84×10^5
100	5851	7.8×10^5
104	7650	1.02×10^6
108	9808	1.31×10^6

续表

温度(K)	压力(mmHg)	(Pa)
112	12360	1.65×10^6
116	15351	2.05×10^6
120	18854	2.51×10^6
124	22960	3.06×10^6
126.2	25463	3.40×10^6

液氮的标准沸点为 77.4K，而其三相点温度为 63.2K。两者相差不到 15K，且三相点的压力不很低，因此较容易用真空泵抽气减压的方法使液氮降温固化。

表 4-3　　饱和液氮的热物理性质

温度(K)	63	66.7	77.4	88.9	100	111.1	122.2
ρ(kg/m^3)	868.2	857.0	810.5	746.4	687.2	613.5	491.8
c_p[kJ/(kg·K)]	1.99	2.00	2.04	2.11	2.25	2.58	3.00
μ (10^{-4}Pa·s)	2.92	2.46	1.58	1.06	0.85	0.75	0.70
K [W/(m·K)]	0.163	0.155	0.139	0.120	0.100	0.080	0.056
hfg(kJ/kg)	213	210	199	182	162	133	79
Pr	4.30	3.16	2.31	1.86	1.92	2.41	3.77

四、低温绝热与液氮低温容器

由于低温液体的温度比室温低很多，所以必须将低温液体贮存于绝热性能良好的容器内，否则由于环境向内传热，会使低温液体很快蒸发消耗。这类绝热良好的贮存低温液体的容器称为杜瓦容器(Dewar Vessel)。

(一) 低温漏热(冷)的基本途径及其防止

图 4-5 给出一个液氮杜瓦容器的结构示意图。容器内贮液氮，其温度为 77K，。容器外是室温，约为 298K(25℃)。内外温差高达 221K。

(1) 内外胆之间夹层内的气体对流与导热　此夹层内一般被

抽真空，或采用纤维绝热、粉末绝热、多层绝热。在这些情况下，自然对流传热已被完全消除；残余气体导热也可达到最低的“自由分子”状态。

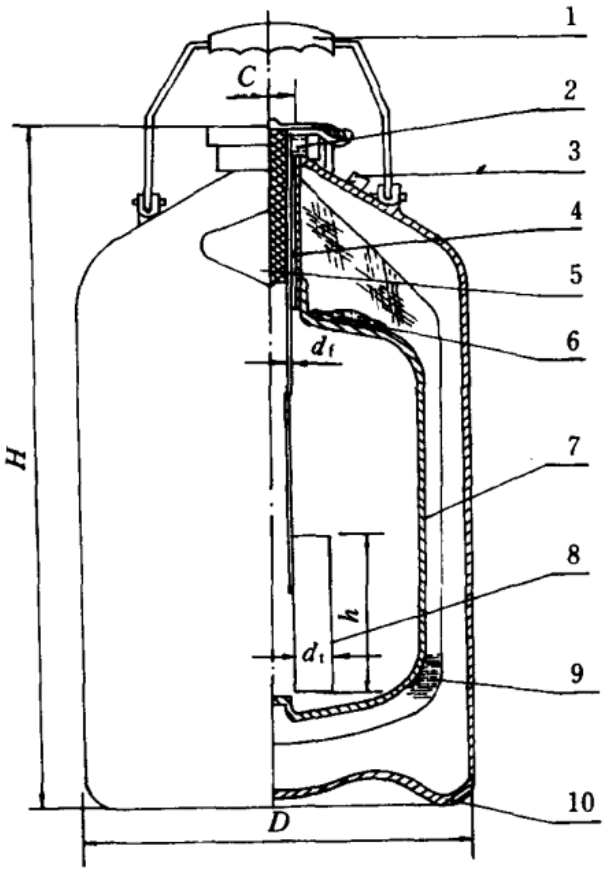


图 4－5　液氮容器结构示意图

1. 提手　2. 盖塞　3. 真空抽气嘴　4. 颈管　5. 标牌
6. 低温吸附剂　7. 内胆　8. 提筒　9. 多层隔热层　10. 外壳

(2) 通过固体的导热

① 通过夹层内绝热材料的导热。

② 通过颈管材料的导热。一般利用逸出蒸气来冷却颈管，使这项导热量大为降低。

③ 通过内胆的支撑和悬吊物的导热。

(3) 辐射传热

① 内外胆之间的辐射传热。

② 通过颈瓶开口与外界的辐射传热。

(二) 低温传热的基本措施和形式

(1) 非真空的泡沫、粉末纤维绝热　其有效导热系数为 10～50mV/(m·K)。

(2) 真空泡沫绝热　其有效导热系数为 4～10mV/(m·K)。

(3) 真空纤维、粉末绝热　其有效绝热系数为 0.1～3mV/(m·K)。

(4) 高真空多层绝热　其有效绝热系数为 0.03～0.1mV/(m·K)。

(5) 真空空心微球绝热　其特点介于真空粉末绝热与高真空多层绝热之间。

上述的有效导热系数是针对 77K 和 298K 给出的，如温度不同，则会有变化。在实用时，要根据所需贮存低温液体的种类和容量，确定相应的低温绝热形式。显然，有效导热系数低的结构形式其成本亦高得多。

(三) 液氮低温容器

贮存液氮的低温容器一般由内胆和外胆两层构成，中间是真空夹层，一般还有金属外壳作保护。内胆材料可用防锈铝合金或不锈钢；外胆材料可用铝合金、碳钢或不锈钢。内外胆的形状，可以是圆形，亦可以是圆柱形。容器的颈管一般较小，若直接用于存放生物样品，可以用特别较大颈瓶的容器。颈瓶的作用是供注入和倾出低温液体，也是液氮蒸发气体的出口，同时也可以作为内胆的悬吊支撑用。

内外胆之间的真空夹层，一般将压力抽至高真空。夹层内可以是真空的，也可以是粉末或多层绝热。内胆的外部可装有活性炭等吸附剂，当低温液体注入后，吸附剂的吸附气体能力剧增，能大大提高真空绝热的效果。

国家标准 GB5458—85“液氮生物容器”规定此类产品的型号为 YDS—□□—□。

其中，第一框□表示容器的公称容积(L)；

第二框□表示特殊型号；

A－表示外形尺寸增高、静态液氮保存期长的高效容器。

B－表示内胆底部或侧面有支撑、耐倾斜、耐运输的容器。

表 4－4　液氮生物容器的规格、尺寸(国标 GB5458－85)

型　　号	几何容积	口径	外径（上限）	高度（上限）	空重（上限）	静态液氮保存期
	(L)	(mm)			(kg)	(d)
YDS—1	1	50	180	335	1.6	7
YDS—3	3.15		224	425	3	22
YDS—10	10		305	530	5.6	70
YDS—10A				600	7.1	100
YDS—15	16		355		8.5	112
YDS—30	31.5		455	670	15	220
YDS—30B				710	16.5	127
YDS—30—80		80		680	15.5	115
YDS—30—125		125		690	16	85
YDS—35	35.5	50	475	670		240
YDS—35—125		125		690	16.5	95
YDS—35—200		200		700	17	50
YDS—50B—80	50	80	500	850	21	125
YDS—50B—125		125			21.5	105
YDS—50B—200		200			22	55
YDS—60—200	63		560	900	32	63
YDS—120—315	125	315	710	1000	63	71
YDS—250—400	250	400	900	1120	140	80

第三框□表示容器口径(mm)。对口径为 50 mm 的可不注。

容器容积有 1L、3L、10L、15L、30L、50L、60L、120L、250L 等。口径有 50mm、80mm、125mm、200mm、315mm、400mm 等。

液氮的绝热性能用静态日蒸发率 Q(kg/d)或保存期 T(d)来表示。一般说来,容积越大,静态液氮保存期越长;同样容积的,口径越大,保存期越短。例如,YDS—10、YDS—30、YDS—30—80、YDS—30—125 的保存期分别为 70 天、220 天、115 天和 85 天。

§4.2 程序降温仪及其应用

低温生物学研究表明,在进行生物材料的低温保存时,不同的细胞要求不同的降温和复温程序,一些复杂的细胞还要求降温程序分成多段进行,每段具有不同的冷却速率。为了满足生物材料低温保存降温过程的要求,可以有多种降温方法;有利用冰箱进行的两步法降温;有利用液氮容器内气相区的温度梯度,用手控办法进行降温的;也有利用溶液的凝固特性实现新的两步法降温。这些降温方法的共同优点是设备简单,操作方便,但却无法实现复杂的降温程序。近年来,随着计算机技术的发展,逐步研制成功了微机控制的降温仪(programmable cooler),它已经成为实现生物材料低温保存技术的一个关键设备。根据降温及控制原理的不同,目前较常用的降温仪大致可以分成两类:①液氮喷射式降温仪(spurt type);②利用液氮容器内气相区温度梯度的升降式降温仪(immersion type)。

一、低温保存对降温仪的要求

在设计低温生物降温仪时,要考虑的因素很多,如降温速率、控温的温度范围、控温的准确度及被冷却样品的数量和形状等。降温速率、控温的温度范围和控温的准确度对传热方式及温度控制系统的设计有重要影响,而被冷却样品的数量和形状在设计冷却室时需要加以考虑。同时,设计时还要考虑方案的经济性和实用性。下面从几个方面讨论一下低温保存技术对设计降温仪的要求。

(一) 工作温度范围

按近代低温生物学理论,实现低温保存的最困难、最危险的温度区域是0℃～－60℃。活细胞的被损伤就是发生在这个温度区域内的降温和复温过程中。因此,降温仪的温度控制范围至少应从室温到－60℃,至于降到多低的温度较合适尚不完全清楚,一般认为是－80℃,因为到－80℃后,可以直接将样品置于液氮,实现满意的低温保存。事实上,许多有关降温速率影响的研究所涉及的温度范围仅在－60℃以上,当然,若在室温到－196℃整个区域内均能实现温度的精确控制,那就更理想了。

(二) 控温速率(不包括玻璃化保存的超快速冷却)

降温速率的范围也是需要确定的。在50～60年代,人们成功地保存哺乳动物的某些细胞,当时所采用的降温程序是:1℃/min到－15℃,然后4～5℃/min到－79℃。尽管这一降温方式用于许多类型的细胞获得了成功,但越来越多的证据表明,某些细胞要求更慢的降温速率。到70年代,所报道过的最慢的冷却速率是:以0.1℃/min的降温保存人体淋巴细胞和以0.3℃/min保存老鼠胚胎。但是近年来发现,对于体积较大、结构复杂的细胞,往往需要更低的降温速率。而所谓"超慢速冷却"(ultra－slow cooling)方法则要求仪器能提供慢至0.01℃/min的降温速率。某些需要快速冷却的场合如一些微生物的保存,可以通过直接浸入液氮中实现。

(三) 控制精度

降温过程的控制精度包括两个方面:降温速率的控制精度和绝对温度值的控制精度。现有实验表明,速率改变20%甚至更多一些,对存活率的影响并不明显。对控制得很好的线性降温,速率的变化对存活率的影响尚未被仔细定量研究过。虽然,对温度控制应达到什么样的精度没有统一的标准,但一般认为,5%的误差是可以允许的。

至于绝对温度值控制的准确性,在某些情况下非常重要,在另外一些情况下却影响不大。例如,在研究降温过程中连续增加抗冻剂浓度以维持溶液未冻状况的实验中,控温精度应在±0.2℃以

内;另外,如果需要在某一预定温度改变降温速率,这个温度的绝对准确度是重要的。但是,在更多的情况下,降温是以某一恒定速率一直降到低温极限,此时,某一特定时间的样品温度的测量精度就并非十分重要。因此,对于温度允许的误差不能给出单一的标准。但为严格起见,需要达到±0.2℃的精度。

温度和降温速率的控制在样品冻结过程中显得特别重要,因为在冻结过程中,样品要释放大量潜热(latentheat),若控制不当会严重影响冻结后样品的温度和冷却速率。

为了满足上述要求,要对降温仪使用的载冷剂加以选择,比较适用且廉价的载冷剂有固态二氧化碳(干冰)和液氮,二者均能提供低至-60℃的受控温度,它们的一些热物理性质如表4-5所示。干冰的升华温度为-78.5℃,用它使样品在-60℃以下获得较快的降温速率已很困难;而液氮却能达到低得多的控温极限温度,因而,现在的降温仪多选用液氮作冷源。有时候也使用液体冷却槽降温,它是采用常规的压缩制冷循环,以酒精作换热介质,但受温度范围的限制,使用得很少。

表4-5　　干冰和液氮的相变温度和潜热

	干　冰	液　氮
相变温度(℃)	-78.5(升华点)	-195.8(沸点)
相变潜热(kJ/L)	896	161.6

准确和可调的控温过程是通过反馈系统实现的,它不停地监测样品的温度并把它和程序设计的参考温度加以比较,根据比较结果对执行元件进行不断的调整。在微处理机被引入到降温仪的控制系统以后,控温过程变得更为准确和方便了。

二、液氮喷射式降温仪

图4-6是液氮喷射式降温仪的工作原理图,它是由美国的Guenter Baartz等人于70年代末研制成功的。该降温仪由冷却室、低温电磁阀、风扇、温度传感器及放大电路、微处理机和液氮容器等几部分组成。冷却室内室是一内径为31cm、高37cm的不锈

钢圆柱筒，它被安置在高为16cm的圆柱台基座上，基座的下面罩着风扇(3400rpm)和氮气入口；低温电磁阀调节氮气的流量。低温氮气由容积为160L、压力为1519875Pa(1.5标准大气压)的液氮罐提供。

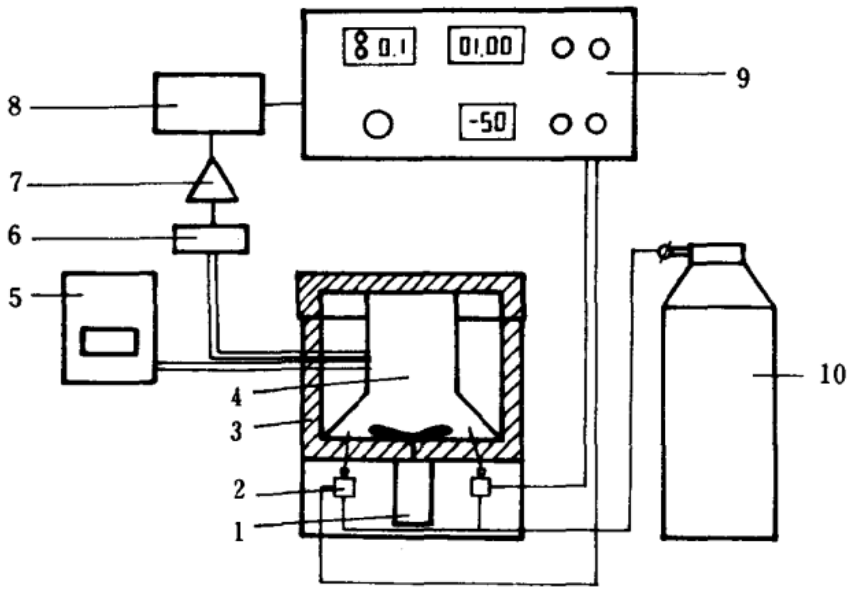


图4-6　液氮喷射式降温仪

1.风扇　2.电磁阀　3.绝热层　4.冷腔(内室)　5.热电偶记录仪
6.冰点参考　7.放大器　8.模数转换　9.微处理机　10.液氮容器

Baartz的降温仪的控温范围为+3.2℃～-65℃，降温速率可以通过面板上的开关选择，分别为0.1K、0.2K、0.25K、1.0K、2.0K、2.5K、5.0K和10.0K/min等9档。近代的喷射式降温仪的速率已发展到步长为0.001K。

三、升降式降温仪

(一) 设计思想

升降式降温仪是基于一种新的设计思想，它是上海机械学院华泽钊提出的。这种降温仪利用液氮的自然蒸发在杜瓦容器颈部所形成的温度场(从0℃以上直至-196℃)，精确地控制生物材料在此温度区内的上下移动，从而有效地控制样品的温度和降温速率。由于步进电机的转速可控性好，因此可利用它带动生物材料

在容器颈部上下移动。当要求生物材料的降温速率大时，加快步进电机的转速，使生物材料的线性位移增加；反之，可降低步进电机的转速，减少生物材料的位移；也可令步进电机停转，使生物材料停留在容器内的某一高度，达到恒温目的；同样，令步进电机反转，样品上提，可以达到升温的目的。

这种降温仪的工作原理如图 4－7 所示。由测温元件测得生物材料所处的温度信号，经运算放大器放大，并将此模拟信号经模数转换器转换成数字信号，被中央处理单元(CPU)接受。CPU 采用集成度高、编程指令丰富、适合用于实时控制的 MCS—51 系列的 8031 芯片。源程序存放在只读存贮器内(RAM)。因为降温仪需要进行人机对话并显示，故增加了扩展口，用以连接显示器和键盘。使用者将降温要求通过键盘输入微机，微机把实测的温度与要求的温度进行对比，根据对比结果对执行机构发送指令，使步进电机转或不转，正转或反转，快转或慢转。步进电机的运行需要进行相电流的分配，并且需要将微机输出的电流放大，因此在微机与步进电机之间专门设计了一套分配与驱动电路。

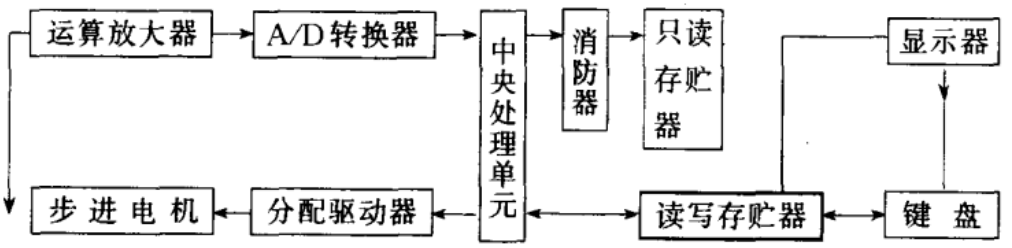


图 4－7　升降式降温仪工作原理

(二) 系统组成

上海华东工业大学低温生物工程研究室陈儿同等人于 1987 年研制成功升降式微机控制低温生物降温仪，并申请了专利。此种降温仪的原理如图 4－8 所示。该仪器由下列几部分组成：①液氮容器，②步进电机，③微机控制系统，④记录仪。

液氮容器一般可选用容积 50L 的杜瓦瓶(Dewar)。杜瓦瓶的口径应稍大(如 200mm)，颈管应加长，以便于操作和形成稳定的

温度场。这种情况下，液氮静态保存天数不少于 55 天，静态蒸发率不大于 0.0182/d。进行降温时，贮存液氮的高度最好在容器总高的 1/3 左右，使气相区具有合适的温度分布。需降温的材料放在托盘上，托盘通过细绳由步进电机牵引。

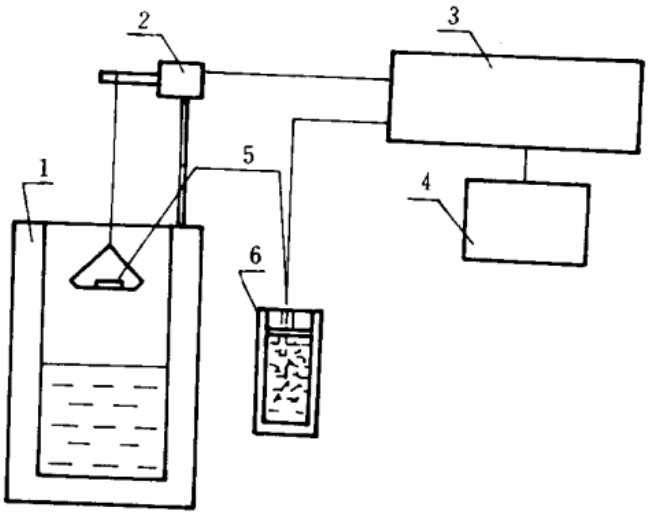


图 4－8　升降式降温仪

1. 液氮容器　2. 步进电机　3. 微机控制箱　4. 记录仪　5. 热电偶　6. 冰水瓶

步进电机是依靠其定子的各相绕组顺序通电而旋转的，步进电机可根据样品的重量等条件进行选择。步进电机被固定在可上下左右移动的支架上，便于安放生物材料与确定初始位置。

测温元件为铜－康铜热电偶，它在低温保存的控温范围内具有良好的热电势关系与温度分辨率，而且其敏感性优于其他测温元件。热电偶选用冰水混合物作为参考点(0℃)。参考点亦可以用补偿电路代替。热电偶的测温点应紧靠生物材料，并随之上下移动。

(三) 技术指标

该降温仪的技术指标如下：

① 控制箱外形尺寸：139mm×360mm×400mm。

② 电源：交流时，AC220V ± 5%，50Hz；直流时，24V(并备有充电电源，可对电池进行充电)。

③ 功耗小于 40W。

④ 控温范围:室温(如 25℃)～－196℃。

⑤ 控温程序的段数:8 段。

⑥ 降温速率范围:0.01K/min～20K/min,或恒温(0K/min)。

⑦ 恒温温度控温范围内的任意温度。

⑧ 恒温时间:0～15 小时/每段。

⑨ 液氮耗量仅大于液氮容器的自然蒸发率。

(四) 性能特点

相对而言,升降式降温仪较适合于较小样品,和液氮喷射式降温仪相比,它具有以下优点:

① 液氮耗量少。这对于需要进行数小时甚至数天连续以极慢速降温的控制过程特别重要。此时若仍采用喷射式降温仪,因液氮耗量较大,在降温过程中需要向杜瓦液氮容器补充液氮,会对降温程序产生严重的干扰和破坏。

② 便于直接保存。一般生物材料用升降式降温仪降至－60℃或－80℃,即可直接进入液氮保存;但对于液氮喷射式降温仪,当达到这一温度时,需将生物材料由降温仪冷却室取出后放于液氮容器中,这样容易引起温度回升。

③ 复温操作方便。只要通过步进电机控制生物材料上升,就能进行程序控制的复温过程。

④ 运行可靠。升降式降温仪可以长期可靠运行,极少发生故障。而液氮喷射式降温仪由于使用了液氮输送管路和低温电磁阀,在使用过程中易引起液氮堵塞和泄漏。

⑤ 易于进行"诱发结晶"(seeding)等操作。为了提高低温保存的存活率,常希望对溶液降至某一温度时进行诱发结晶等操作,这些可以很方便地在升降式降温仪上实现。

目前,升降式降温仪已广泛用于生物、医疗、水产等部门。福建省农科院国家红萍资源中心使用该仪器保存红萍茎尖,经过数百次试验,找到了存活率较高的冷冻程序。中国水产科学研究院长江水产研究所、黄海水产研究所等使用该仪器研究了鱼类和中

国对虾的精液、胚胎等的保存。上海第二医科大学附属瑞金医院使用该仪器观察和比较降温速率对储存皮肤活力及超微结构的影响。上海第一人民医院用它来保存人的胰腺组织和胰岛细胞，为治疗糖尿病作出贡献。中国农科院畜牧研究所已批量应用该仪器，进行建立牛、羊等的优质种类资源库的研究。华东工业大学低温生物工程研究室把该仪器用于电子显微镜生物样品制备中的低温取代，制备极快速冷冻后的肝、胰、心肌等的电镜标本，均获得了理想的电镜照片。

四、降温仪用于生物材料低温保存的热控制问题

生物材料被冷却时，总要发生液相冷却、过冷与晶核形成、液固相变、固相冷却等过程。在用降温仪进行研究时，如果所用样品极少，可以精确地控制细胞所经历的程序。在实用时，无论用安瓿还是用塑料袋，生物材料总是有相当数量的，在降温、复温时都要产生复杂的传热学问题。实验表明，即使使用由计算机控制的降温仪，样品的实际温度和冷腔温度之间总会存在着差别，特别是在相变释放潜热的“平台”之后，两者的温度差更大，很可能超过40℃；同时，两者的降温速率也相差很大，这些都可能严重损伤生物材料。

降温仪所控制的是冷腔中的温度，当样品不是足够小时，由于传热学方面的原因，生物样品的实际温度并不等于冷腔中的温度，这一点可从图4－9所示的纯水的降温过程看出。我们试验中使用的是英国生产的一种程序降温仪(PLANAR, Programmable Biological Freezer)。图中曲线对应着降温速率为1℃/min，直径为10mm的试管盛3ml水时的情况。试验结果表明：

(1) 结冰过程不是在冰点B发生的，而是在低于B的C点先形成冰的核心，接着纯水温度立即跳回到接近0℃。$\Delta T=(T_B-T_C)$被称为过冷度。过冷度的大小和溶液的纯度、容器表面的光洁度、清洁度、冷却速率的快慢等都有关系。ΔT过大对细胞会产生致命损伤。在进行生物材料的低温保存时，可通过“诱发结晶”避免产生过大的ΔT。

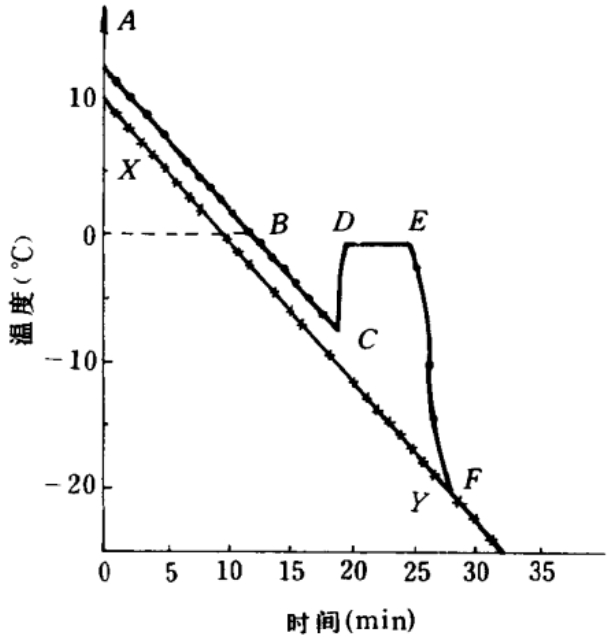


图 4－9　试管中纯水的降温曲线

×－×　降温仪冷腔温度　·—·直径为 10mm 试管的中心温度(试管中盛水 3mm)

(2) DE 是水不断结成冰、释放潜热的过程。它所经历的时间长短和样品的容量、降温仪内部的传热情况等有关。

(3) EF 是冰的降温过程，由图中可以看出，如降温仪的降温过程仍保持不变，那么 EF 段的降温速率将远大于 XY，而且难于控制。

实际上，生物材料低温保存所处的溶液，并不是纯水，而是低温保护剂(CPA)溶液，降温过程的实际情况比上面的更复杂。所以，为了达到理想的低温保存效果，光有性能良好的降温仪是不够的，还必须研究样品的热学性能，研究其热分析和热控制的问题，进而确定合理的降温程序。

§4.3　低温显微技术

一、低温显微技术的作用、发展和应用

为了弄清楚生物材料低温冷冻损伤的机理，人们希望能直接

观察到生物样品在冷冻和复温过程中的形态变化，并能将它们和过程中各种参数变化结合起来分析，这对于客观地解释实验结果或修正人们提出的模型和保存程序都是非常有利的。在冷冻和复温过程中，生物样品中的活细胞及其环境都经历了复杂的变化，要想从直观上精确地阐明这一过程，只有借助于低温生物显微镜。

低温显微技术可以定义为，在微观尺寸上动态地、直观地研究低温下发生的过程的技术。这一技术既可以应用于生物组织的冷冻和复温过程的研究，也可以用于其它领域中的低温现象的研究。

低温生物显微镜可以控制生物体的温度在一定范围内任意变化，直接观察和摄录生物体在冷冻、复温过程中的形态变化，以及溶液相变的详细过程；再结合图像处理技术，可以对冷冻和复温过程进行定性和定量研究。这对于确定最佳的降温、复温程序以及生物体在冷冻、复温过程中的损伤机理等均有很大的帮助，因而它被看作是低温生物学研究的最重要、最基本的设备之一。

由于人们对生物体在低温下的变化很感兴趣，所以很早就试图做低温显微学方面的工作。它的历史可以追溯到一百多年以前。1860 年，Jolius Sachs 博士把光学显微镜搬到房间的窗口，依靠寒冷环境的冷却，观察植物叶部切片在冷冻过程中的冰晶形成和复温过程中的细胞壁变化；1897 年，德国科学家 Molisch 将光学显微镜搬到冰天雪地里，观察变形虫和某些植物细胞在低温下的变化，此后，他致力于研制能主动冷却的低温显微镜。后来，Schander 和 Schaffit 将简单的冷头加入显微镜，造成一些低温环境，但是冷却和加热的速率却是没法控制的。一直到本世纪 60 年代，低温显微技术还处于极其初级的阶段。美国麻省理工学院的 Diller 和 Cravalho 在 1971 年研制了第一台自动控制的低温生物显微镜，并在这方面做了大量的研究工作，开创了现代低温显微技术的新纪元。1984 年，Steponkus 等把视频技术和计算机图像增强技术结合起来，开发了一个用于冷冻细胞的高分辨率低温显微镜系统。

二、Diller－Cravalho 系统

（一）工作原理

该系统的原理图如图 4－10 所示。它主要由冷冻台、模拟温度控制单元和高速照相机等组成。冷却剂以恒定的速率流过冷冻台以提供冷量，电加热器以不同的功率向样品散发热量，通过调节二者的相对数量来形成不同的冷却和复温速率。当加热器不散发

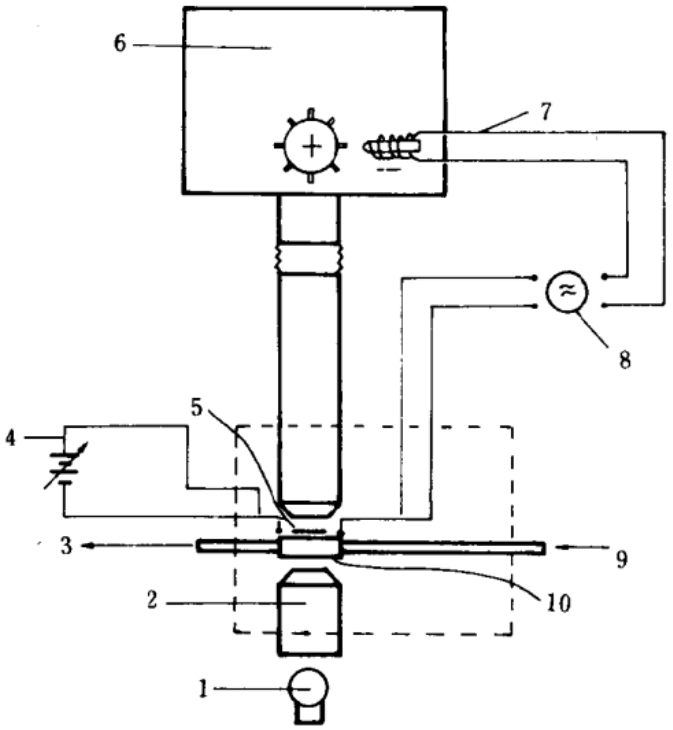


图 4－10　Diller－Cravalho 显微镜系统

1. 氙灯　2. 相差式显微镜　3. 液氮(出口)　4. 电加热回路
5. 样品放置窗口　6. 高速旋转照相机　7. 照相帧数计数器
8. 双射线示波器　9. 加压液氮(入口)　10. 冷冻台

任何热量时，将达到最大的冷却速率；当关掉冷却剂并使加热器持续加热时，将达到最大的复温速率。通过直置式显微镜的光路系统，高速旋转式照相机以每秒 400 至 2000 幅的速度摄下所发生的动态过程。在照相机的驱动链轮的附近放置了一个电磁探头，链轮每转过一齿，就产生一个电脉冲，用以监视指定时间内的照相帧数。电磁探头的信号还起着把照片记录的事件和对应的温度联系起来的作用。为了达到这个目的，把探头和热电偶的电压信号以相同的时间基准画在曲线记录仪上，某一帧图由两个电压脉冲来

识别，这两个脉冲之间的热电偶输出值就是拍摄该帧画面时样品的温度。该显微镜系统采用氙灯做光源，以满足高速摄影机对照明的要求。

Diller－Cravalho低温工作台的示意图如图4－11所示，低温

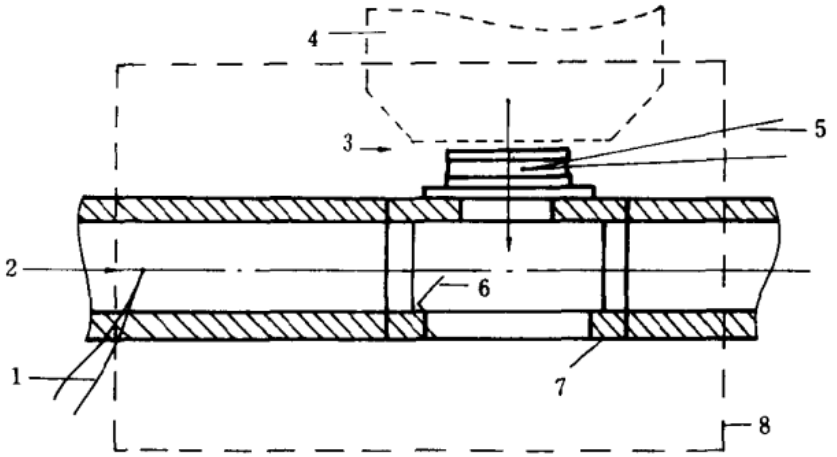


图 4－11　Diller－Cravalho 低温台

1. 热电偶(测冷却剂温度)　2. 冷却剂　3. 干燥气体　4. 物镜

5. 热电偶(测样品温度)　6. 偏流板　7. 换热腔　8. 系统边界

台的主体是一个不锈钢的换热腔，两端焊有供冷却剂进出的管道。在换热腔的上下端各开有一个供透光用的石英玻璃窗口。经过预冷、加压的氮气以恒定的流速流过换热腔，为系统提供冷量，形成冷环境。换热腔的进口装有偏流板，把进来的气流导向上窗口的底部，加强对流换热。上窗口石英盖片的下表面镀有一层透明的氧化锡薄膜作加热器，其电阻值可以通过改变镀膜的厚度加以调节，通常是几百欧姆的数量级，且在 37～－196℃ 的温度范围内不随温度变化；导电膜由铜极引出到加热电源。样品可以直接放置在上窗口的石英片上，再盖上一块透明盖片；它也可以夹在两块盖片之间，再放置在石英窗口上。这两种方法各有优缺点，前一种方法可以减少热阻和热惯性，但安装时不如后者方便。不论那种放置方法，上盖片都用氢氟酸蚀刻出一个小洞，用以放置直径为 0.025mm的铜－康铜热电偶。热电偶的探头越小，热惯性越小，因而反应速度越快。热电偶的输出信号被引入到示波器或记录仪

上，显示和记录样品的平均温度。

低温台的外面套有一个外罩（虚线部分），里面充有足够维持正压的氮气，以防止显微镜镜头等光学元件在工作过程中出现结霜结露现象。

二、我国的低温生物显微镜系统

华东工业大学低温生物工程研究室于 1985 年研制成功一套大型低温生物显微镜系统，它在低温台结构、控温方式等方面均与 Diller－Cravalho 系统有所不同。

（一）系统的组成

这台大型低温生物显微镜主要由下列系统组成：

（1）采用倒置式研究显微镜，包括目镜（广视，10 倍、16 倍）、长工作距高平均消色差正负相衬物镜（2 倍、10 倍、25 倍、40 倍）和长工作距平均消色差物镜（4 倍、10 倍、20 倍、40 倍）。

（2）液氮冷源和热水热源及它们的控制系统。在本系统中，冷却由液氮提供冷源，在液氮杜瓦容器的出液口上装有低温电磁阀，可用来控制冷气流。本系统中的加热由热水提供，热水的温度靠恒温槽水浴和电磁阀控制，在一般的生物实验中，由于要求的水温不高，可以利用自来水。

（3）低温样品台。对于这个台，在生物学、化学、热学上都有较高的要求。在生物学上，要求能在这个试样台上放置装有活的生物体的培养皿，并能方便地取走和放入样品，能保证细胞（或组织）能在其中培养。在热学上，要求被研究的试样的温度分布较均匀，且能按给定的程序要求进行降温和复温变化，降温、升温的速率可以任意给定，也可以在任何情况下保持恒温状态。本试验台的降温速率可达 0～50K/min，复温速率可达 + 50℃/min（用气）和 100℃/min（用水），完全能满足大多数低温生物学研究的需要。在光学上，要求低温试样台的放置不影响显微镜的光学性能，应很方便地进行观察、拍照和电视摄像。为了防止空气中水分在低温台表面及光路系统结霜，要求采取特殊的措施。

（4）摄像、录像系统。本低温显微镜系统采用 SonyVO—5630

型 3/4″台式录像机、DX—1800PK 型摄像机和 CX111—1850CH 型 20″显示器。这套摄像、录像系统的质量很高，有很高的分辨率。本低温显微镜上还装有 35mm 胶卷的照相机，用它可以随时摄得清晰的照片。

在研制过程中，我们对原有摄像机和显微镜的联结光学通道进行了改进，使电视显示器和目镜上的视野对比由原来的 1/9 提高到 1/2。

(5) 微型计算机系统。用 AST386 微机控制。可用此微机系统按给定的程序对低温试样台进行降温、升温控制，能收集到试样的变化信息(如温度等)并对它们进行计算和分析，测量、计算、分析的结果可以被储存在计算机磁盘中，也可用打印机绘出。

(6) 温度测量和控制系统。它包括测温元件铜－康铜热电偶、热电偶电势放大器、模数(A/D)转换器和电磁阀等。整个低温生物显微镜中的各子系统及它们之间的联系示于图 4－12。

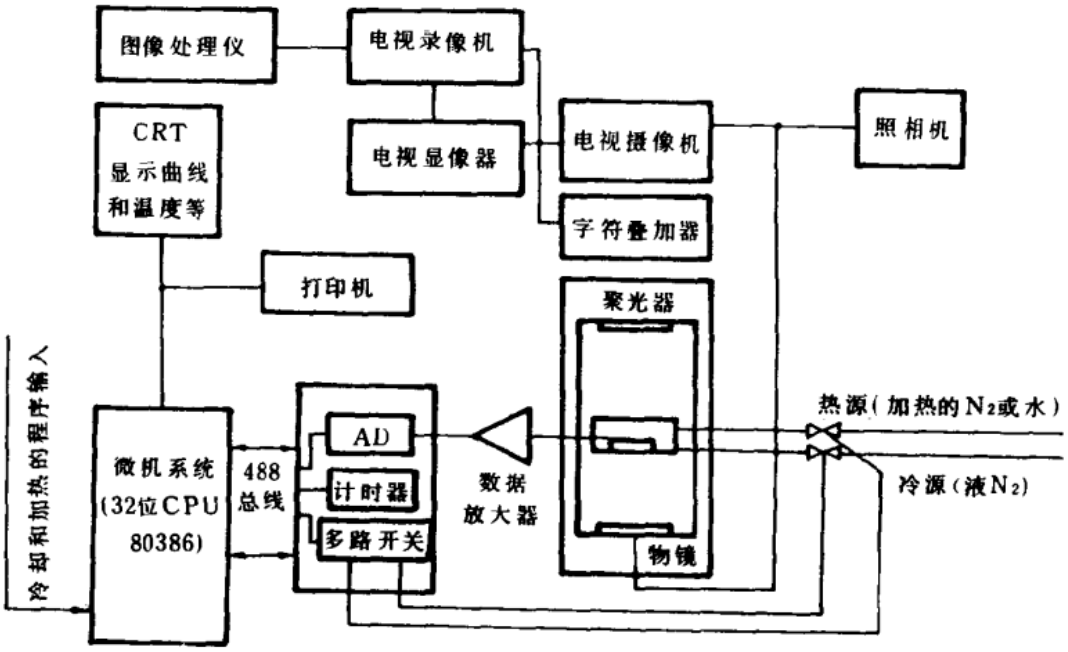


图 4－12　大型低温生物显微镜系统框图

(二) 调温方式

样品的调温是在专门设计的低温显微工作台内实现的。图 4－13 是低温显微工作台的结构图。冷(热)气流通过工作台内腔的分布环吹在玻片上,玻片将冷量(或热量)传给样品。冷(热)气流量由微机控制的两个电磁阀调节,只要调节电磁阀在采样周期内的开启时间便可调节样品的升(降)温速率。另外,在工作台中还设置了氮气扩散通道,它将氮气散吹在工作台的上下空间,使镜头附近形成一个氮气幕,显微镜保护罩内也充满氮气,以防止光学元件因低温结霜结露。实践证明,这种结构的工作台的热学和光学性能都很好。

(三) 温度测量和控制

样品的温度用 ϕ0.06mm 的铜－康铜热电偶测量,热电偶的电势信号由 ICL7650 放大后经接口(Microlink Ⅲ)中的 12 位 A/D 转换后送至微机,微机收到信号后即与参考信号相比较并由此给出阀开时间代码,再由接口送至阀门控制单元的计数器。控制单元根据微机的命令打开电磁阀并进行减计数,到计数至零时自动切断电磁阀。

采样周期的确定:本系统的采样周期是 1 秒,微机用查询方式读机内时钟。

控制方式:采用 PID 控制方式,离散的 PID 算式中的三个系数通过实验整定。

阀门占空比的确定:为了缩短系统的采样周期,阀门的开启计时由阀门控制单元完成,阀门的控制周期与采样周期一样长。我们选择阀门占空比以 1/100 为间隔,因而在 1 秒钟内共有 100 种不同的阀开时间,它们从 1/100 秒到 1 秒内变化。在程序中,这些占空比用一个一维数组表示,数组下标对应着控制算式的计算值。

实验过程曲线显示:利用微机的图像软件,将用户设计的程序和实测的温度变化均以温度－时间曲线显示在屏幕上,用户可以从屏幕上及时地了解过程控制的情况。在全部过程结束后,屏幕上的曲线可用打印机打印出来。

低温生物学研究往往要涉及到复杂的降(升)温程序。在软件

设计中，我们将它分段线性化，并按低温生物学研究的习惯，用温度变化的速率和终了温度来描述每一过程，用户温度程序可以分段组合而成。

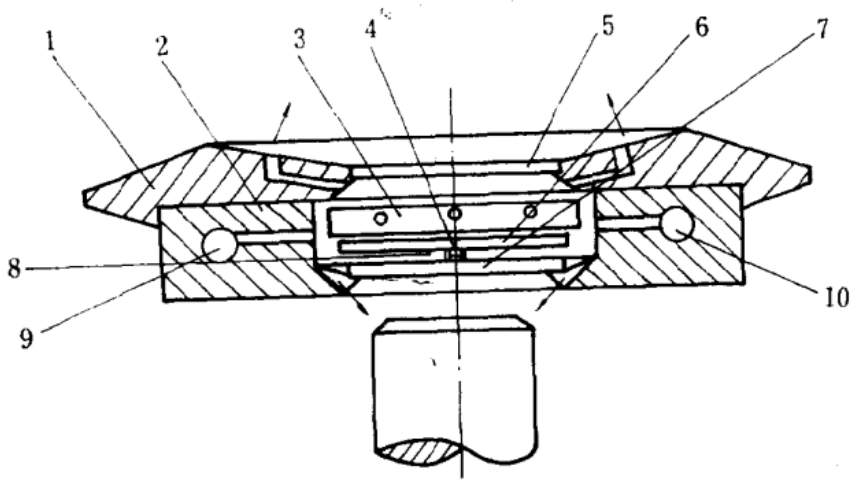


图 4－13　低温工作台结构示意图

1.防霜盖　2.基底　3.气量分布环　4.样品　5.透光窗
6.导热玻片　7.载玻片　8.微热电偶　9.冷源通道　10.热源通道

（四）摄录像系统中的实时字符叠加器

这套低温显微镜系统配置了字符叠加器。字符叠加器是自行研制的单片微机系统，它可以把温度、时间等信息以字符形式叠加到视频信号上，使摄录图像时同时录下必要的实时物理数据。这样，在重放时，电视屏幕上显示出图像的同时也显示出该图像所对应的实时温度和时间，从而给进一步分析研究带来了方便。

（五）数字图像处理系统

低温生物显微镜系统得到的显微图像数量很大，单纯由人工来分析它们相当繁琐，而且由于肉眼对灰度的识别能力和尺寸分辨力的限制，若采用人工直接分析，所得到的结果往往比较粗糙。利用数字图像处理技术，将这些系列图片取样和量化，由计算机进行运算和分析，不仅可以大大减少研究者的重复劳动，而且所得结果的可靠性和可重复性也大大提高。这套显微镜系统配置了常州计算机公司生产的数字图像处理板，可与 AST386 或其他个人计

算机构成微机图像处理系统。系统随硬件提供了一个可以直接在计算机上运行的基本图像处理包和一个单独的功能函数库，通过软件调用，可对显微镜系统得到的图像进行诸如取样和量化、直方图均匀化、滤波、区域定位和图像计算等多项操作，以便进行定量分析。

（六）系统的基本性能和特点

（1）系统采用可靠的防结露结霜措施，保证显微镜在低温下能正常工作，经多次实验，证明此方法非常可靠，且易操作。

（2）该系统温度调节范围为室温至－180℃，精确控制温度范围为室温至－120℃，精确控制降温速率可达－50K/min，精确控制升温速率可达50℃/min（用氮气复温）或100K/min（用水复温）。用8位A/D转换器时，控温灵敏度为0.5℃；用12位A/D转换器时，可达0.1℃。这些参数已足够满足低温生物学研究的要求。

（3）本系统的低温级光路清晰。采用了高质量的摄像机、录像机和显示器，能够得到分辨率很好的清晰的动态图像。利用这套系统已经清楚地观察和摄录到溶液在结冰时的过冷现象、冰晶形成、冰晶大小及细胞形态变化等精细过程，并已结合图像仪进行数字图像处理。

（4）系统的样品台采用特殊结构，以使样品的温度能够快速控制和精确测量。在本结构中，测温元件热电偶直接置于样品溶液中。

（5）系统具有双录音通道，其中一条通道可用于记录实验现场的信息，如报告试验条件和发现现象等，另一条可供以后分析录像带用，使用方便。

（6）系统采用较高质量的32位机控制、计算和处理数据，显示终端可直接显示过程；打印机可绘制过程曲线。本系统采用平行处理方法，计算和采样的数据用硬件回路加以存储，这样就可以和控制过程同时进行，从而缩短了控制时间，提高了控制精度；采用高级语言编程，对操作人员要求较低。

(7) 采用了新的冷量、热量控制方案。美国麻省理工学院采用恒定冷量(液氮流量恒定),用电加热器来产生可调节的热量。他们采用的电加热器是一块直接镀在试样玻璃板上的透明氧化锡膜的电阻加热器,电阻为 100Ω 或 200Ω,这种薄膜加工工艺要求很高,寿命很短。本系统采用直接用计算机交替控制制冷、热源的两个电磁阀。实践证明,这种方法所达到的控制精度,能很好地满足试验要求,同时可大大节省液氮和氮气的消耗。冷、热阀交替控制采用同一程序,操作可以完全自动化。

1988 年,华东工业大学低温生物工程研究室利用数字图像处理仪,对由低温生物显微镜中拍摄的图片进行数字图像处理,从而求得未冻液体的面积占图片总面积之比,亦即得到未冻溶液份额的实验值,所得结果与用三元相图计算值相近,这是用低温显微镜进行定量分析的比较成功的例子。此外,该室还用低温生物显微镜结合图像处理仪对人体精子、皮肤、白细胞等的低温保存进行了研究,取得了一批有价值的成果。

低温生物显微镜已在低温生物学研究中得到了广泛的应用,它可以获得有关生物体及其保护剂在冷冻过程中的大量信息,其中包括:不同降温速率下的胞内和胞外冰晶的形成和生长;相变过程中的界面移动和溶液浓度分布;细胞的渗透现象及其对细胞膜的损伤;细胞成分(如细胞质)的动态变化等。随着显微镜分辨率的提高,在引入了图像处理技术以后,已可以利用低温生物显微镜进行定量分析,这将为摸清低温损伤的机理带来方便。

§4.4 形成玻璃化的超快速冷却方法

玻璃化是近年来细胞保存的一种新的方法。欲实现水溶液的玻璃化,要求很高的冷却速率。对于纯水,要求 106K/s;对于一般溶液,要求 $10^3 \sim 10^4$K/s;而对于浓溶液,即所谓玻璃化溶液,要求 $10^2 \sim 10^3$K/s。

将生物样品直接浸入液氮,即使对于直径只有 0.2mm 左右的

样品，冷却速率也只能达到 103K/s 左右。这是因为处于室温的样品会在液氮上方的蒸气层中被“预冷”，气相传热效果差；而当样品进入液氮后，会使样品周围的薄层液氮气化，产生气膜，也抑制了冷却速率的提高。

在生物医学中，目前采用的快速冷却方法主要有沉浸法、喷溅法和固体接触法三种。

沉浸法是将生物样品快速地浸入(或弹入)低温液体中。如果此液体处于饱和态，如 77K 的常压液氮，它受热后会在样品表面迅速形成一层气膜，降低了传热效果，也降低了样品被冷却的速率。若此液体处于过冷态，则可使样品冷却速率大为提高。这种过冷态的液体可以是被液氮过冷的具有较高正常沸点的丙烷、乙烷、氟里昂等。图 4－14 示出了我们研究电镜样品快速低温固定的实验系统。低温液体(1)是被液氮(8)过冷的氟里昂；生物样品

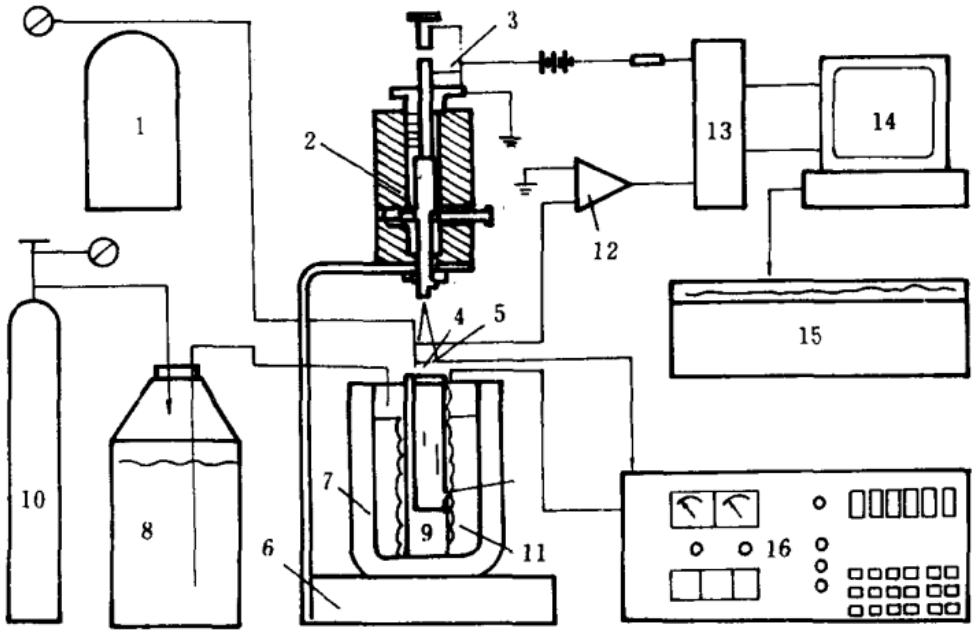


图 4－14　超快速冷却的过冷氟里昂试验系统

1. 氟里昂　2. 弹射器　3. 紫铜簧片　4. 样品　5. 热电偶　6. 支架　7. 保温瓶
8. 液氮　9. 冷却剂筒　10. 高压氮气　11. 加热器　12. 运算放大器 PCL 889
13. 高速数据采集卡 PCL　14. PC－XT 计算机　15. LQ－2500 打印机　16. 控温仪

(4)或实验用的微型热电偶((5)被弹射器(2)以高速弹入氟里昂中。时间、位移、温度等变化的数据,经运算放大器(12)和高速采集卡(13)进入计算机(14)处理。其最快采集速率可达 125kHz。试验表明,0.2mm 直径的热电偶被弹入经液氮过冷的 R22,平均降温速率可达 10^4K/s,要比直接弹入 77K 液氮的降温速率高一个数量级。

喷溅法是将低温液体经过喷嘴高速喷溅到生物样品上,或是将生物样品的悬浮液高速喷溅进入低温液体中,以达到样品被快速冷却的目的。

镜面接触法是将生物样品快速地与某固体镜面良好地热接触,而此固体镜面是预先被冷却至 77K 或更低温度。为了达到高的冷却速率,要求固体镜面具有高的导热系数和比热,常用的有铜、银、蓝宝石等。理论上讲,固体接触法可获得更高的冷却速率,但实际上由于镜面的污染、样品与镜面的不理想、贴合时可能产生的反弹等因素,实际冷却速率会受到很大影响。

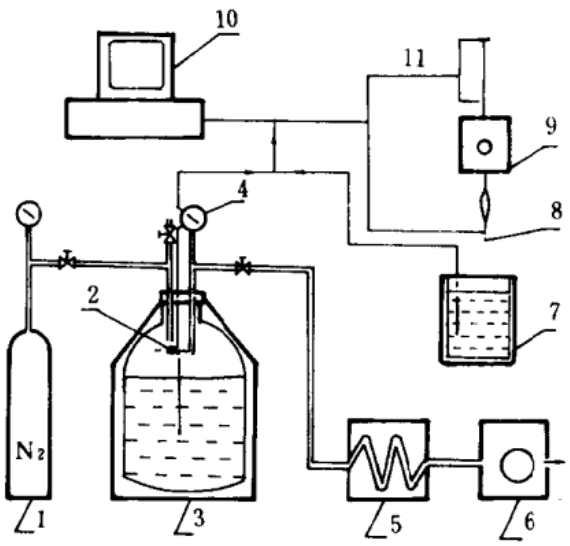


图 4-15 超快速冷却的过冷液氮试验装置

1. 高压氮瓶 2. 扩散器 3. 大液氮容器 4. 真空压力表 5. 热交换器 6. 真空泵 7. 小液氮杜瓦 8. 试样 9. 弹射器 10. 计算机 12. 测速装置

利用过冷低温液体取得高冷却速率的另一方法，是近年发展起来的过冷液氮法，如图 4－15 所示。其基本原理是将一个小的液氮杜瓦(7)浸在大的液氮容器(3)内，利用真空泵对大容器(3)进行抽空，使之减压降温。经一段时间后，整个大容器内的液氮(包括小杜瓦内的液氮)均达到接近三相点的状态，温度低达－207℃。然后停止抽空，恢复常压，打开大容器，去其盖，取出小杜瓦。此时小杜瓦内的液氮处于 101325Pa(760mmHg)下的过冷状态，其过冷度达 5～11K。将生物样品快速弹入此过冷液氮，就可获得极高的冷却速率。如图4－16所示，此冷却速率与液氮的过冷度、样品

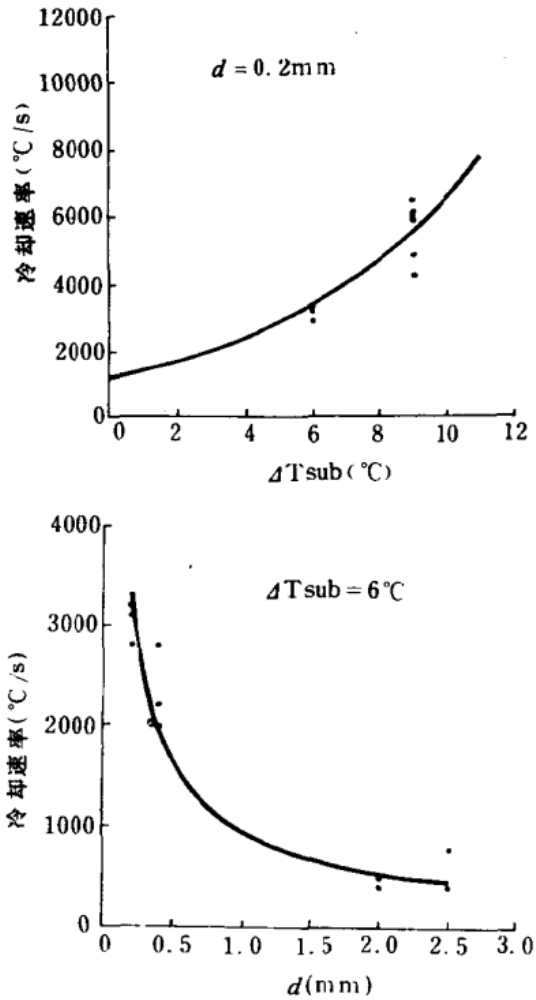


图 4－16　在过冷液氮中冷却速率与过冷度 ΔT_{sub}、样品直径 d 的关系

的尺寸、样品的速度等有关。在我们的试验中，对0.2mm的样品，最高冷却速率达10^4K/s左右。

§4.5 低温真空干燥技术

一、低温真空干燥技术

（一）低温真空干燥技术的范围

低温真空干燥技术（简称冻干技术），英语名为freeze drying或lyophilization。其基本方法是先将物料低温冻结，然后用真空技术将物料中的水分抽干，使之干燥。目前，冻干技术主要应用以下几个方面：

（1）食品材料，特别是营养食品、调味品等的保存。

（2）无活力的生物材料的冻干保存，如血浆、血清、荷尔蒙等，以及作为移植骨架用的动脉、骨骼、皮肤等。

（3）有活力的生物材料的冻干保存，即经冻干后仍能得到活的生物体，其中主要是指多种微生物冻干保存，包括动植物病毒、噬菌体、病原细菌、支原体、链霉菌、放线菌、立克次氏体、真菌、酵母菌、微细藻类。

（4）制造超细微粒。近代电子、冶金、航空工业需要制备超细微粒，而低温真空干燥是一种近年开始应用的有效方法。其基本程序是先将材料制成均匀的溶液，然后用喷雾的方法，将溶液以雾状颗粒喷入－196℃液氮，使颗粒快速固化，再用真空泵将物料干燥，能形成毫微米（10^{-9}m）级的超细微粒。

（二）生物材料低温真空干燥保存的基本程序

（1）制备和预处理。通常将微生物悬浮于含保护剂的分散剂中，分散剂中可含蔗糖、葡萄糖、白蛋白、明胶、乳糖、二甲亚砜（DMSO）、聚乙烯咯烷酮（PVP）等。对不同的微生物要采用不同的预处理工艺。

（2）预冷。

（3）一次干燥。

(4) 二次干燥。

(5) 后处理。它包括封装和储存。经冻干的生物材料一般可在室温或4℃环境下长期保存,但应避免光线照射。

(三) 冻干保存法与低温保存法的比较

(1) 在低温保存中,生物材料必须长期放在低温(如 -196℃)条件下;而冻干保存的生物材料可以在室温环境下长期保存,可以使储存条件大为简化,大大降低储存费用。

(2) 冻干保存的预冷实质就是低温保存的降温阶段,也就是说,成功的低温保存是实现冻干保存的先决条件。至今,凡能实现冻干保存的微生物,均可成功地低温保存;而有些微生物,如原生动物(protozoa),可以成功地低温保存,但却很难能冻干保存。

(3) 某些生物材料可能在干燥过程中产生变异。

(4) 冻干保存在真空干燥过程中,要使用真空设备和加热设备,这些使冻干材料的制备费用较高。

二、预冷过程的要求和实施

(一) 预冷过程的要求

预冷就是要使经预处理的生物材料溶液结晶固化,这里涉及两个重要的系数,即降温程序和最终温度。

(1) 降温程序或降温速率　冻干保存的预冷降温和我们在第4章讨论的慢速降温低温保存方法十分类似。最主要的问题是,针对不同的生物材料,要采用不同的降温速率。此降温速率还与预处理的溶液成分、处理方法有关;对于复杂的生物材料,在降温过程中还要采用分段降温,即采用特定的降温程序。降温速率过快,会造成胞内冰;降温过慢,因生物体在高浓度溶液中时间过长而受溶液效应,这些均会导致活体损伤、死亡。

降温速率(或降温程序)对生物存活率的影响,对于许多微生物一般不很明显,但对原生动物的低温保存已很明显,对于更复杂的细胞、组织就成为关键的影响因素。

(2) 预冷的最终温度　对于冻干保存来说,预冷的最终温度应低于溶液的低共晶温度(eutectic temperature),以保证能使悬浮

生物材料的溶液能全部冻结。从理论上讲，预冷的最终温度只要比低共晶温度低些就可以了。但由于实际溶液的组成复杂，很难精确测定共晶温度，为保险起见，一般将预冷降到－30℃以下。虽然这样做要多费些能量，但对使用干冰、液氮冷却，或用现有的冻干机来说，达到这样的温度在技术上是没有问题的。

应该指出，－30℃低温保存的储存温度是明显偏高的。因为在这样的温度下，已晶体化的溶液仍会产生再结晶等变化，会损伤和致使生物体死亡，所以低温保存的储存温度一般要在－70℃或－196℃（液氮温度）下。但是，对于冻干保存来说，预冷只是干燥的前过程，生物材料经过预冷后，接着就进行干燥，故在－30℃下存放时间不会很长，不致于产生损伤。

（二）预冷过程的实施

作为预冷所需的冷源，可以采用下列办法：

（1）利用干冰（固体 CO_2）和乙醚混合，最低可达到－72℃。

（2）利用液氮或液氮蒸发出来的冷氮气，最低可达到－196℃。

（3）利用压缩式制冷机，一般单级压缩可达－30～－40℃；双级压缩或复叠式制冷循环可达－60～－80℃。在许多冻干机中均用这类压缩式制冷系统。常见的真空冷冻干燥机的隔板温度可达－30～－50℃。

以上冷源可以提供预冷过程的最终温度；至于预冷过程的降温速率，则需操作人员自行控制。一般来说，降温速率取决于：①冷源的温度；②样品数量、容器体积和表面积；③样品容器和冷环境之间的传热情况。

有经验的操作人员可以摸索出实现不同降温速率的方法。在摸索过程中，应用热电偶或电阻温度计实测样品温度随时间的变化曲线，从而得到降温速率。对于降温速率要求很严格的样品，可以用微机控制的程序降温仪，自动实现预冷过程的控制。

三、真空技术

（一）真空

真空是指压力低于大气压力的气体状态。人们按压强的高

低，划出如下真空区域：

低真空：　　1×10^{5}Pa～1×10^{2}Pa

中真空：　　1×10^{2}Pa～1×10^{-1}Pa

高真空：　　1×10^{-1}Pa～1×10^{-6}Pa

超高真空：　　$<1\times10^{-6}$Pa

生物材料的真空干燥，常用的真空范围是1～100Pa，属于中真空的范围。

（二）真空的获得

真空是靠真空泵抽走气体而形成的。真空泵的工作原理大致有以下几类：

① 利用压缩膨胀，包括往复式泵、液环泵、旋转泵和罗茨泵。

② 利用粘性抽吸原理，如蒸气喷射泵。

③ 利用扩散抽吸原理，如蒸气扩散泵。

④ 利用分子和离子作用，如分子泵、离子泵。

⑤ 利用化学吸附和物理吸附原理，如吸附泵、低温泵等。

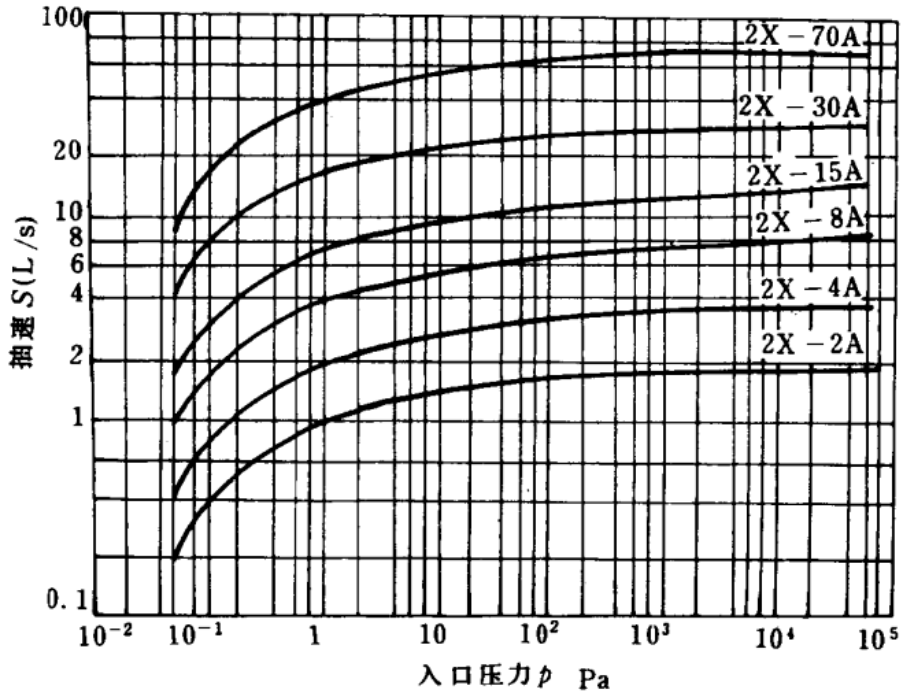


图4－17　2X系列旋片泵的抽气特性曲线

在冻干技术中用的真空泵主要有旋转泵、罗茨泵、蒸气喷射泵和蒸气扩散泵。真空泵的最主要参数有两个：

① 极限压力，即最低可达的压力。

② 抽气速率。

下面举例说明几种真空泵的参数。

(1) 旋片式真空泵　这是旋转泵的一种型式，我国生产的2X系列旋片泵的主要技术性能为：极限压力为 $1\times10^{-2}\sim6\times10^{-2}$ Pa；抽速为0.5～70L/s；采用油密封。抽气特性曲线见图4－17

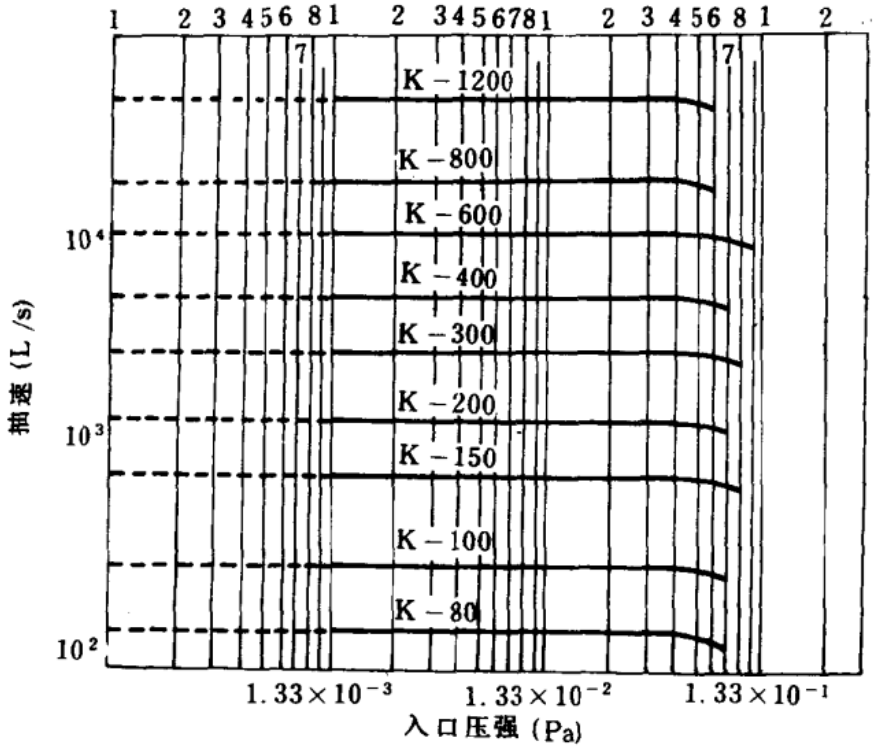


图4－18　几种油扩散泵的抽空特性曲线

(2) 罗茨泵　由两个腰形转子组成，由于没有像旋片泵中的摩擦件，所以转速可以提高到1450r/min、2950r/min，抽气速率可增大到30～20000L/min，极限压力达到 5×10^{-2}Pa，但要求配置前级泵。对于30～300L/min抽速的，可用旋片式作前级泵；对大于300L/min的，要用机械增压泵(ZJ)或滑阀泵(H)作前级泵。

(3) 扩散泵　通常用油加热沸腾形成蒸气，通过喷嘴形成高

速射流，将容器中的气体吸出并向油蒸气中扩散而被带走。

扩散泵的特点是极限压力可以达到 1×10^{-3}Pa，抽气速率也可以很大，但需要一个前级泵（粗泵）先形成 $10^{-1}\sim10^{-2}$Pa 的中真空，这可以用机械泵来完成。扩散泵的抽空特性曲线见图 4－18。

四、真空干燥技术

（一）生物样品中的水分

在低温真空干燥的预处理过程中，生物材料是置于含保护剂的分散溶液中，这样的样品含水比例极大。按其去除难易程度，水分大致可分为两类：

（1）溶液中的水分和生物材料中的自由水。这部分水分可以通过升华（即一次干燥）去除。

（2）生物材料内部的结构水。它们是以吸附、渗透等物化形态存在，或者以化学结合的形态存在于材料的组织结构中，这些水分无法用升华方法取样，而必须用加热、蒸发的方法去除，这就是二次干燥。

（二）一次干燥

一次干燥就是利用升华方法去掉材料中的自由水。表 4－7 和图 4－19 给出冰和水的饱和蒸汽压力和三相图。

表 4－7　　冰的饱和蒸汽压力

温度（℃）	－70	－60	－40	－30	－20	－10	0	10	20	30
压力（Pa）	0.3	1.1	12.9	39.6	103.5	260.0	610.2	1.22×10^{3}	2.33×10^{3}	4.23×10^{3}

水的固、液、汽三相共存点为 0.01℃和 610.2Pa。对于温度处于三相点以下的固相，欲使其升华为气体，有两个方法：一是升温，如图上线 AB 所示；另一是抽空降压，如图上线 AC 所示。从理论上讲，这两种方法均能产生升华干燥的效果。实际上光靠抽空降压很难达到干燥的目的，因为在低温下冰的蒸汽压力很低，压力差产生的蒸汽扩散很小；而且升华过程本身也要吸热（0℃冰的升华热为 2800kJ/kg）。所以，实际上一次干燥过程总是加热和抽空两

种方法均使用的。升华阶段的加热一般通过提高冻干机中隔板温度来实现。当隔板温度提高后，热量通过固体传导、辐射以及内部气流的对流，传给样品，使之升温。隔板的温度要进行严格的控制，既要防止样品中的部分冻结温度超过共晶温度而产生融化，还要防止样品的已干燥部分的温度超过崩解温度而产生性变。随着干燥部分的逐步完成，升华速率减慢，升华所需的热量减少，此时应及时降低加热量，否则也会损伤样品。总之，隔板温度和热量的控制是升华干燥阶段的一个极重要的内容。

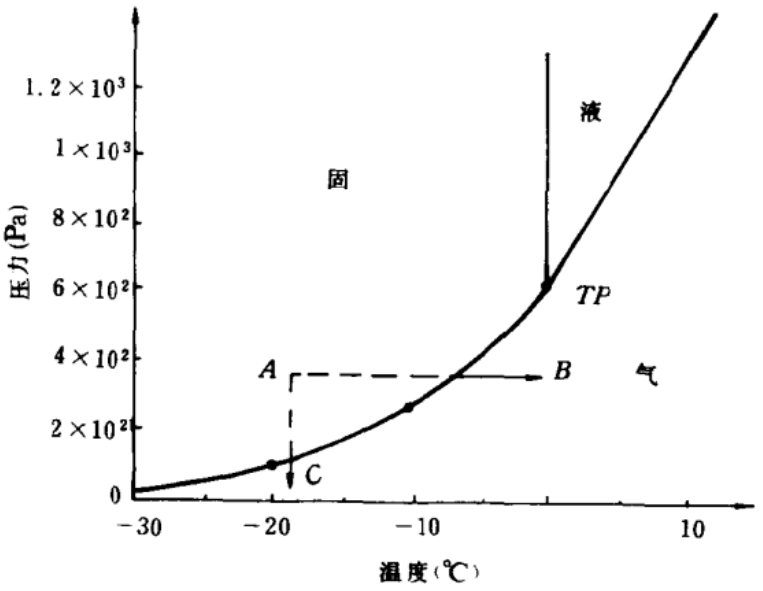


图 4－19　水的三相图

近年发展的微波加热法也可用于二次干燥的加热，在加热过程中也同样需考虑控制样品温度的问题。

（三）二次干燥

二次干燥的目的是去除部分因吸附等机理存在于生物材料中的结构水。所以，二次干燥又被称为解吸附干燥。由于吸附的能量很大，所以在二次干燥中必须提供足够的热量。二次干燥的温度可以提得较高，如对生物材料可提高到 30℃；也可以采用扩散泵，或用五氧化二磷作吸附剂。

第 2 篇　微生物低温生物学

第 5 章　低温微生物

§5.1　低温微生物的基本概念

在地球上，微生物是分布得最为广泛的一类生物，可以说微生物无所不在。微生物种类繁多，不同种类的微生物之间千差万别，它们的分布规律也各具特色。微生物与其所处的环境之间是相互作用的，微生物的分布受各种环境因素的影响，环境因素的改变也会使微生物发生某种程度的相应变化来适应新环境；另一方面，不同微生物由于各自适应不同环境的能力不同，也会导致它们的分布不同。地球上有各种各样的环境，包括一些极端环境，如高温、低温、强酸、高盐、高压环境等。在不同的极端环境中存在着各式各样的微生物，在微生物的进化过程中，自然选择使一些微生物对极端环境有较强的适应性，这些微生物被称为极端环境微生物。近年来，对极端环境微生物的研究日益引起人们的重视，研究极端环境微生物可以为生物起源及进化、微生物分类提供新的证据，还可以用极端环境微生物的某些特殊性质来丰富生物学的研究方法和内容。例如，从温泉中分离到的水生嗜热菌（*Thermus aquaticus*）细胞内的 Taq DNA 聚合酶，在聚合酶链式反应（PCR）中作为

一种重要的工具酶。

低温环境是一种极端环境，在这些低温环境中存在大量的微生物。自从 1887 年 Forster 分离到能在 0℃ 条件下生长的微生物以来，人们已经从许多自然的与人造的低温环境中分离到了各种类型的微生物。尽管人们研究低温微生物已经有一百多年，但从历史上看，关于低温微生物还没有一个统一明确的概念。先后出现过的描述低温微生物的名词有 glaciale bakterien，rhigophile，psychrotolerant，psychrocartericas，psychrobe，thermophobic bacteria，cryophile，facultative psychrophile，obligate psychrophile 和 psychrotophic bacteria 等。显然，我们不能笼统地将从低温环境中获得的微生物都称为低温微生物，因为许多非低温微生物在低温条件下并未死亡，而是处于休眠状态，这些处于休眠状态的微生物在适宜的温度条件下又可恢复活力而进行生长。有些研究者根据微生物的最适生长温度以及生长的上下限温度来进行定义，如 Morita 将那些最适生长温度等于或低于 15℃，上限生长温度等于或低于 20℃，下限生长温度等于或低于 0℃ 的微生物称为嗜冷菌(psychrophile)。例如，有些从南极水域中分离到的微生物的上限生长温度低于 10℃。然而，有些微生物不仅可以在 0℃ 条件下生长，在 20℃ 以上的温度条件下也可以进行生长，一些嗜温菌(mesophile)如巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌或某些节杆菌和棒杆菌等均可在低于 5℃ 的温度条件下进行生长；而鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)在 −20℃ 和 40℃ 的温度条件下生长一样良好，这些微生物显然不属于 Morita 所确定的嗜冷菌的范围。Eddy 将那些能在低于或等于 5℃ 的温度条件下生长(无论其最适及上限生长温度是多少)的微生物称为营养型嗜冷菌(psychrotroph)。除上述两个概念外，Hucker 还提出了兼性嗜冷菌(facultative psychrophile)的概念，将那些偶尔能在 Morita 所确定的嗜冷菌的生长温度范围生长的微生物归于此类。以上三个关于低温微生物的概念中，兼性嗜冷菌的概念较为模糊，首先是“偶尔”的尺度较难掌握；其次，正如其定义所表述的，偶然的因素较多，难以说明其在低

温条件下的生长是其本身性质所决定。因此，这个概念不常为人们所用，但我们可以借用兼性嗜冷菌这个名称(见后)。嗜冷菌(psychrophile)的最适生长温度低，而且生长的温度范围较窄，我们可以将这类微生物称为专性嗜冷菌，从某种意义上讲，专性嗜冷菌可称为真正意义上的低温微生物。相比之下，营养性嗜冷菌(psychrotroph)这个概念的涵盖范围较为广泛，从 Eddy 所定义的概念来看，专性嗜冷菌也属于营养性嗜冷菌。为了便于区别，我们将除专性嗜冷菌之外的其它的营养性嗜冷菌称为兼性嗜冷菌。总而言之，在本章中，将专性嗜冷菌和兼性嗜冷菌合称为低温微生物，亦即将所有能在低于或等于 5℃ 条件下生长的微生物称为低温微生物。

§5.2 低温微生物的分布特点及栖息环境

一、分布特点

微生物个体微小，可以借助气体及水体的流动、动物及人类活动而四处传播，因而分布十分广泛。微生物种类繁多，适应性强，可以在不同的环境条件下生长。但是，当具体到某一类微生物时，由于各类微生物自身所具有的特性不同，它们对同一环境的适应能力不尽相同。微生物自身的特点是影响微生物分布的内因，环境因素是影响微生物分布的外因，内因和外因的综合作用导致在不同环境条件下微生物的分布各具特色。影响微生物分布的环境因素包括营养、水分、通气条件、温度、压力、光线、pH、盐度及拮抗微生物等等。其中温度是影响微生物分布的一个十分重要的环境因素。温度对微生物的影响是通过改变其生理活性来实现的，例如生化反应速度的快慢，蛋白质、核酸等生物大分子的稳定性及酶的催化活性高低，获得水分的难易程度，细胞膜的流动性等等。

由于地理位置的差别、季节变化及阳光的照射程度不同，使地球上不同区域温度差别很大。虽然地球上存在一些高温环境，如一些温泉的水温可达 100℃，但地球上生物活动的大部分地区温

度偏低。占地表70%以上的海洋约90%的部分温度低于5℃。极地陆地及常年积雪高山等地区的温度也常年低于5℃。在10000米高空,气温低于10℃,高度增加,气温进一步降低。生物圈约80%以上的部分为永久性低温地区,即常年低于5℃的低温环境。除上述自然的低温环境之外,地球上还存在许多人为的低温环境如冷库、冰箱等。

根据温度变化的程度,我们可以将低温环境分为稳定的低温环境和不稳定的低温环境。深海温度稳定,属于前者;而大部分温带地区土壤温度随季节交替由低于0℃至25℃以上变化,属于后者。值得注意的是,我们不能将永久性低温环境与稳定的低环境混淆,即使在某些永久性低温地区,温度也很不稳定。例如,一些极地地区的空气及土壤的温度可在-88.3～5℃这个范围变化。从稳定的低温环境(如深海和冰洞)中分离出来的微生物通常为专性嗜冷菌。它们对高于其上限生长温度(20℃)的温度条件非常敏感,为狭温性微生物(stenothermal microorganism)。这些专性嗜冷菌的一个显著的特点是,它们通常为革兰氏阴性菌,特别是那些上限生长温度在10～15℃范围内的细菌,多为直的或弯的杆菌,多属于假单胞菌属和弧菌属等。当然,从稳定的低温环境中也分离到革兰氏阳性菌,如节杆菌、棒杆菌和短杆菌。相比之下,从不稳定低温环境(如极地土壤、湖泊、冰层及高空气体等)分离出来的微生物的生长温度范围较宽,即使其原位环境温度从未超过15℃,有些微生物在高于其原位(in situ)最高环境温度20～30℃的条件下也能生长。另外,还有一些微生物能够忍受低于其下限生长温度50℃的温度,在这种不稳定低温环境中难以分离到专性嗜冷菌,通常分离到的兼性嗜冷菌多为革兰氏阳性的球菌和杆菌,主要有节杆菌、棒杆菌、短杆菌及库特氏菌等,这类微生物的特点是在极端环境条件下有较强的生存能力。

低温微生物的生长受多种因素的综合影响,相对来说,在稳定的低温环境中主要受营养条件的影响,而在不稳定低温环境中主要受温度及水分的影响。低温微生物生存时间的长短与次级代谢

作用有关。有人根据在原位(in situ)条件下是否能进行连续的代谢作用,将微生物分为两类:一类是固有型(autochthonous)微生物,另一类是发酵型(zymogenous)微生物。固有型微生物能利用其天然环境中的原有有机物质进行低速而稳定的代谢活动;发酵型微生物则倾向于利用新加到其所处环境中的"新鲜"有机物质进行代谢活动。真正的固有型微生物没有次级代谢系统,这些微生物一直在进行着初级代谢作用,它们长期生存的机会较少。稳定的低温海洋环境中的固有型微生物因长期适应稳定的低温条件而成为专性嗜冷菌。与固有型微生物不同,发酵型微生物不仅在稳定的低温环境中存在,在不稳定的低温环境中也能存在。在稳定的低温环境中的发酵型微生物一直进行着低水平的生理代谢,而在不稳定的低温环境中的发酵型微生物只在解冻的夏季(取决于温度高低和水分获得的难易程度)具显著的生理活性,当温度进一步降低时则最终进入休眠状态。发酵型微生物在经过旺盛的生长期后即进入较长的停滞期,并在这段时间内进行次级代谢。在最佳条件下进行次级代谢作用的微生物处于最佳的存活状态。值得注意的是,微生物进行次级代谢作用的最佳条件与微生物生长或进行初级代谢作用的最佳条件是不一致的,从温度这方面说,进行次级代谢作用的最佳温度常比最佳生长温度低 20℃,因此,对发酵型微生物来说有两个最佳温度。海洋环境中,发酵型微生物具有在高于原位环境温度条件下生长的能力,而在原位温度条件下(低于最佳生长温度 20℃)可以进行次级代谢作用,所以低温海洋环境中大量的兼性嗜冷菌多为发酵性微生物。在稳定及不稳定低温环境中的兼性嗜冷菌有一个显著的特点:它们在原位低温条件下进行初级代谢作用的速度虽然十分缓慢,但很有效,特别是考虑到大多数低温环境中的营养物质水平较低,太快的代谢作用会很快地消耗可能获得的有机物质,而低速高效的代谢方式有利于它们的长期生存。

从总体上讲,兼性嗜冷菌较专性嗜冷菌分布更为广泛,这与它们对温度变化有较强的适应能力有关。

二、栖息环境

低温微生物的栖息环境可分为自然低温环境和人造低温环境。自然低温环境从其属性上又可分为土壤、水体、大气三种。人造低温环境主要指冷库、冰箱等。

（一）自然低温环境

（1）土壤　地球土壤温度随地理位置不同及季节变化相差很大，而且有的地方温度很稳定，有的地方不稳定。一些温带地区土壤温度常年基本低于20℃，而极地土壤温度则常年低于冰点，但也有一些局部极地区域的土壤温度可由低于冰点到高于30℃变化。

温带地区土壤温度的特点是不稳定，随季节变化甚至昼夜交替而变化。在这种不稳定的环境中分离到的多为兼性嗜冷菌，即使在冬季也难以分离到专性嗜冷菌。一些典型的土壤微生物如芽孢杆菌、梭菌和假单胞菌的生长温度范围都较宽，它们在40℃和低于冰点的温度条件下生长一样良好，很多的温带土壤微生物都能在5℃的条件下生长。表5－1列举了一些非极地地区不同土

表5－1　　非极地土壤样品中低温微生物数量

位　置	土壤类型	培养温度（℃）	微生物数量（个/克干土壤）
温带土壤		4.5	7×10^5
温带土壤	花园	4	4.3×10^7 个/克湿土壤
阿尔卑斯山	冰川	4	$0.6\times10^6\sim3.6\times10^6$ 个/克湿土壤
北欧	森林	2	$1.5\times10^6\sim3.9\times10^6$
路易斯安那州(美)	花园、草地	0	<10(夏季) <100(冬季)
加拿大东部	冻土	3	$1.3\times10^6\sim6.5\times10^5$
华盛顿州(美)	花园	0	$0.92\times10^3\sim1700\times10^3$
	耕地		$23\times10^3\sim810\times10^3$
	非耕地		$420\times10^3\sim3100\times10^3$
温带土壤	罐头厂周围	2	$1.5\times10^5\sim7.4\times10^5$ 个/克湿土壤

壤样品中低温微生物数量的情况。

从表 5－1 我们可以看到，由于土壤的位置、类型不同，培养温度和方法的差异等，不同土壤中的低温微生物的数量差别很大。尽管如此，我们还是可以得出结论：温带土壤中存在着大量的低温微生物。

极地土壤一般为永久性低温环境，但北极地区土壤温度也随地理位置及季节交替而变化，降水量及土壤上面的冰雪对土壤温度也有影响，某些地区在夏季的温度高于 20℃。南极陆地可分为海岸区和内陆区，海岸区土壤为较为温和的低温环境，水分含量高、土壤类型多，由于企鹅、海豹等动物的活动以及地衣、藻类等低等植物的生长使某些海岸区土壤富含有机物质，不同海岸区土壤年平均温度由－10℃至－20℃变化，在夏季则由－1℃至－6℃变化。相比之下，内陆区土壤干燥、缺少水分，某些地区岩石表面温度在夏季可高达 32℃。在两极地区土壤中广泛存在低温微生物，永冻层上面的"活性层"(active layer)土壤中的微生物数量与温带地区土壤中的微生物数量相似。表 5－2 和表 5－3 分别例举了北极和南极土壤样品微生物数量。

表 5－2　　北极土壤样品微生物数量

位　置	土壤类型	培养温度(℃)	微生物数量(个/克干土壤)
阿拉斯加(美)	泥炭、壤土	2	$9.6\times10^3\sim380\times10^3$
加拿大北部	非耕地	2	$0.7\times10^4\sim1500\times10^4$
	耕地	2	$4.9\times10^4\sim280\times10^4$
阿拉斯加(美)	沼泽	3～5	$1.2\times10^4\sim1500\times10^4$
加拿大北部	有机土壤、耕地	4	$1\times10^4\sim560\times10^4$(放线菌)
	非耕地等	4	$2\times10^4\sim600\times10^4$(其它微生物)
	沙壤	10	$8\times10^3\sim159\times10^3$
	砂砾	10	$1\times10^3\sim25\times10^3$
	湿壤或岩石边缘	10	$0.8\times10^3\sim11.2\times10^3$

极地土壤低温微生物有细菌、粘细菌、放线菌、蓝绿藻等。总

的来讲，北极地区土壤中的微生物种类及数量较南极更类似于温带地区土壤微生物。

地球上还存在许多洞穴，其中一些洞穴的温度常年在0℃以下到10℃变动，这些洞穴除了温度低以外，还缺光线和有机物质，并且有较高的湿度。从这些洞穴土壤中分离到的一些专性嗜冷菌与在某些冰冻土壤中分离到的 *Arthrobacter glaciales* 相似。这种专性嗜冷菌在－5℃到18℃范围内生长，最适生长温度为13℃。

表5－3　　南极土壤中低温微生物的数量

位　置	土壤类型	培养温度（℃）	微生物数量（个/克干土壤）
Signy岛	泥炭	10	$486\times10^3\sim2200\times10^3$
维多利亚岛	干燥土壤	2	$8\times10^3\sim18\times10^3$
	湿壤	2	$1.2\times10^5\sim14\times10^5$
罗斯岛	人类活动区域	2	$1.1\times10^6\sim63\times10^6$
Macquarie岛	砂砾	10	4.3×10^5
	岩石	10	2.9×10^6
Wheeler干谷	沙土	2	$0.1\times10^3\sim100\times10^3$
Matterhorn谷	沙土	2	10～370
	壤土	2	$0.1\times10^2\sim3500\times10^2$
维多利亚岛	沙土	2	$0.26\times10^4\sim2700\times10^4$
	沙质壤土	2	5～30
干谷		5	$10\times10^5\sim2.5\times10^5$

（2）水体　低温水体环境可分为淡水环境和盐水环境。前者主要包括湖泊、江河、池塘、冷泉等；后者主要指海洋、盐湖等。除此之外，我们将冰、雪也归于低温水体环境。

① 淡水环境：温带地区湖泊表面动荡层水温随气候条件而变化，而湖底静水层的温度大多常年低于4℃。湖面动荡层中低温微生物多为兼性嗜冷菌，因为湖面水温在夏季常高于25℃。在湖底静水层中，低温微生物在4℃条件下可进行矿化作用。Rao等在安大略及苏必利湖中分离到一种黄杆菌，这种细菌在0℃条件下比在20℃条件下吸收的 O_2 多，说明其在低温条件下有较强的生理活性。

极地和高山湖泊的水温常年低于4℃，在那里有许多专性嗜冷菌存在。例如，Tilzer在一个高山湖泊中发现每升湖水中有$2\times10^8\sim8\times10^8$个微生物。当然，在极地和高山湖泊中也有许多兼性嗜冷菌生存，Christensen在北极湖泊沉积物中分离到兼性嗜冷菌。

有些研究人员在0～3℃条件下，从一些河流中分离到细菌和真菌，但在这些微生物中很难找到专性嗜冷菌。Stokes等在0℃条件下，从一条河流中分离到的微生物中有16%～47%为兼性嗜冷菌。

在一些洞穴中有一些冷泉，水温常年在5.5～15℃变化，在水体及沉积物中有微生物生存，但也多为兼性嗜冷菌。另外，在井水、农田水、池塘及沼泽等地方也发现有兼性嗜冷菌的存在。

② 盐水环境：地表有70%以上的地区为海水覆盖，另外还有许多盐湖，这些地方存在大量的低温微生物。对海洋中的微生物而言，温度、盐度、压力、O_2及pH等共同影响它们生理活性，它们大多在低于5℃的温度条件下生活。在高纬度地区，水温波动不大(常低于5℃)。在中纬度地区，表层水温随季节交替由2℃至16℃变化，而底层水温一般低于5℃。靠近南极的水体温度接近0℃，Wiebe等在南极水域中就分离到专性嗜冷菌。北极地区深层水温可低达－1.9℃。不同海区水温的不同会影响微生物的种类、数量及其生理活性。近海水体和沉积物中，低温微生物的数量随季节变化。一般来说，随海水深度的增加，微生物数量下降；而在底层海水中存在大量的专性嗜冷菌。值得注意的是，几乎所有的嗜压菌(barophile)均为专性嗜冷菌。水体中大部分微生物不是独立悬浮的，而是通常吸附在碎屑、颗粒上，这样能使这些微生物有效地利用有机物质，但由于低温、压力等因素的影响，这些微生物的活性较低。除水体外，海底沉积物中也有大量的微生物存在，Wiebe等在5℃条件下从每毫升海底淤泥中分离到10^4个微生物。另外，在海洋动物肠道和体表及植物的表面存在大量的兼性和专性嗜冷菌。总的来看，海洋低温微生物中兼性嗜冷菌占大多数，相比之下，专性嗜冷菌较少。这些专性嗜冷菌的共同特点是：它们都为革兰氏阴性、不形成孢子的好氧型杆菌，多数为弧菌，也有梭菌

和粘细菌。表5－4列举了一些海洋专性嗜冷菌。

表5－4　　海洋专性嗜冷菌

菌　名	来　源	最适生长温度（℃）	最高生长温度（℃）
弧菌	鱼类排泄物	16	20
嗜纤维菌	银鲑	15～20	20
弧菌	海水	15	20
弧菌	比目鱼卵	?	19
梭菌	海底沉积物	8.2～10.7	16.3～17.5
弧菌 18—300	海水（南极）	7	13
弧菌 18—500	海水（南极）	10	16
弧菌 Ap—2—24	海水（南极）	4	9
假单胞菌、螺菌、弧菌	海水（北海）		＜20

在南极有一些高盐度的低温湖泊，其中有很多低温微生物（见表5－5）。

表5－5　　盐湖低温微生物

湖名及特点	分离微生物的温度（℃）及计数方法	微生物数量（个/毫升湖水）	种　类
Bonney 湖			
深度：32 米	直接计数	$1\times10^3\sim1.2\times10^5$	
温度：－2～7℃	0℃平板计数	0～460	
盐度：0.25%～21.7%	4℃平板计数	$10^2\sim10^3$	
Vanda 湖			
深度 60 米	直接计数	$0.4\times10^3\sim1\times10^3$	蓝绿藻
温度 0～24.2℃	0℃平板计数	0～210	
盐度 12%			
Don Juan 湖			
深度 11 米	0℃或 25℃培养		芽孢杆菌、微球菌
温度－3～－24℃			棒杆菌、酵母菌
盐度 47.4%			

Don Juan 湖水含有极高的盐分（约45%），过高的盐浓度使湖

水在－48℃的低温条件下也不结冰，细菌和酵母菌是湖水中仅存的生物。这些微生物为嗜盐菌，它们在0℃和25℃的条件下生长一样良好，从这点上看，它们为兼性嗜冷菌。

除上述液态低温水体外，地球上还存在低温固态水，主要指冰、雪。已有许多关于冰雪中存在微生物的报道。以前，人们曾观察到有的雪被染成红色，实际上这是由于“雪藻”(snow algae)引起的，这些雪藻在10℃以上不能生长，为专性嗜冷微生物。Hoham获得了 *Raphidonema nivale*、*Chloromonas pichinchae* 和 *Cylindrocystis brebissonii* 这三种雪藻的纯培养，它们的最佳生长温度分别为5℃、1℃和10℃，即使在－2℃条件下也生长良好。Sorokin等在冬季日本海冰中分离到硅藻，有的硅藻群落上还附生着大量的细菌。另外，Moiroud等在冰川冰中分离到专性嗜冷菌(细菌)。有意思的是，Barsdate等在阿拉斯加一个无名湖的冰层中发现有大的空泡，这些空泡中有紫、粉红及绿色的可进行光合作用的细菌和少量的藻类。极地海冰中也存在大量的藻类及细菌。有研究表明，约70%的海冰细菌是小杆短杆菌。

(3) 大气　地表上空为大气层，随着高度增加，气温逐渐降低，某些地方的温度低达－40℃。在1000米以上的高空，气温基本低于10℃。在空气中生活着大量的微生物，从地表到27000米的高空都能分离到微生物，包括细菌、真菌等。Fulton等发现，在超过3000米的高空有细菌存在，而那里的温度低于5℃，而在温度低于冰点的极地上空分离到的微生物在－20℃的条件下能长期生存。空气中的微生物一般来自土壤及海洋等水体环境，当大气在陆地及水体表面流动时，将那里的微生物带走，这些微生物就会随气流升入高空。Cameron等在南极上空分离到的一些微生物如棒杆菌和微球菌的最佳生长温度接近25℃。Proctor分析了7000米高空的空气样品，那儿的温度低于－20℃，有的地方甚至低于－40℃，样品中的主要细菌是典型的土壤微生物。从3000米高空空气样品中分离到的细菌约34%可在0℃条件下生长，其中大部分可在－39～－26℃条件下存活48小时。这些细菌大部分为芽

孢杆菌，是一些能在0℃以下生长的土壤低温微生物。

（二）人造低温环境

人造低温环境主要指冷库、冰箱及工业用冷却水等。Barnes等在冷冻的禽肉中分离到一些低温微生物，其中一些在1℃条件下可培养14天，而另一些可在－3℃条件下生长。另外，在冷藏的其他食品如牛肉、鱼及奶制品中也分离到许多低温微生物。不仅在这些营养丰富的冷藏食品中存在低温微生物，Mcloy在营养物质缺少的工业用循环冷却水中也发现有细菌、真菌及藻类。由于这些人造低温环境与人类的日常生活及生产密切相关，对于其中存在的微生物的研究也日益引起了人们的重视，这些研究将为人类健康及工业生产的顺利进行提供有价值的理论依据。

§5.3 低温微生物的种类

低温微生物种类繁多，包括细菌、真菌、藻类等。由于对低温微生物还缺乏广度和深度上的研究，而且现在已知的低温微生物在分类学上已属于不同的属，在此我们并未对低温微生物进行分类学意义上的系统分类，而是以属为单位对已知的低温微生物的种类进行总结并列出某些种的低温微生物。

一、粘细菌

（1）橙色粘球菌（*Myxococcus fulvus*）

（2）小堆多囊菌（*Polyangium sorediatum*）

从北极土壤中分离出的这两种粘细菌具有分解纤维素的能力，但它们在低于6～8℃的条件下难以生长。

二、蓝细菌

从北极土壤中分离到的一种念球菌（*Nostoc commn*）在1℃条件下可以进行固氮作用。

三、细菌

在已知的低温微生物中，细菌是数量和种类最多的，我们将一些主要的低温细菌的种类及其各自的特点列于表5－6：

表 5-6　　低温细菌

菌　　名	来　　源	备　　注
嗜纤维菌属(*Cytophaga*)	北极湖泊	适应低营养、高盐环境
无色菌属(*Achromatium*)	南极盐湖	栖息地湖水盐度高达 47.4%
螺菌属(*Spirillum*)	北海海水 江河淤泥	可以固氮
假单胞菌属(*Pseudomonas*)		
丁香假单胞菌(*P. syringae*)	树叶	作为"冰核"在形成冰雪的过程中起作用
荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)	食物	在低于 5℃条件下生长很好，污染冷藏食品
恶臭假单胞菌(*P. putida*)	冷冻食物	在低于 5℃条件下生长很好，污染冷藏食品
莓实假单胞菌(*P. fragi*)	冷冻食物	在低于 5℃条件下生长很好，污染冷藏食品
微红假单胞菌(*P. rubescens*)	冷冻食物	在低于 5℃条件下生长很好，污染冷藏食品
致金假单胞菌(*P. aureofaciens*)	冷冻食物	在低于 5℃条件下生长很好，污染冷藏食品
黄单胞菌属(*Xanthomonas*)	冷冻食物	低温条件下分解蛋白质
变形杆菌属(*Proteus*)	冷冻食物	低温条件下分解蛋白质
固氮菌属(*Azotobacter*)		
圆褐固氮菌(*A. chroococcum*)	南极冻土	固氮
印度固氮菌(*A. indicus*)	南极冻土	固氮
根瘤菌属(*Rhizobium*)	北极	固氮
克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)		
产气克雷伯氏菌(*K. aerogenes*)		在低温条件下通过增加酶量来弥补酶活性低
沙雷氏菌属(*Serratia*)	冷藏食物	
耶尔森氏菌属(*Yersinia*)		
鼠疫耶尔森氏菌(*Y. pestis*)		−2～−54℃生长一样好

续表

菌　　名	来　源	备　　注
弧菌属(*Vibrio*)	土壤	
海产弧菌(*V. marinus*)	海水	
鳝弧菌(*V. anguillarum*)	鱼	
气单胞菌属(*Aeromonas*)	冷冻食物	
黄杆菌属(*Flavobacterium*)	土壤、冷冻食物	
脱硫弧菌属(*Desulfavibrio*)	南极	厌氧条件下,进行硫酸盐还原作用
莫拉氏菌属(*Moraxella*)	湖水、冷冻食物	
不动杆菌属(*Acinetobacter*)	湖水、冷冻食物	
微球菌属(*Micrococcus*)	南极盐湖、冷冻食物、鱼	0℃和25℃生长一样好
嗜冷微球菌(*M. cryophilus*)		细胞膜内的不饱和脂肪酸并未增加,而是通过缩短饱和脂肪酸链来保持膜的流动性
葡萄球菌属(*Staphylococcus*)	冷冻食物	
八叠球菌属(*Sarcia*)	南极	
芽孢杆菌属(*Bacillus*)	温带土壤、南极盐湖	
芽孢杆菌 TA41(B. TA41)	南极	产蛋白酶
巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)	温带土壤	-2～-40℃生长一样良好
枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)	温带土壤	-2～-40℃生长一样良好
嗜冷芽孢杆菌(*B. cryophilus*)		
蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)	冷藏食物	
环状芽孢杆菌(*B. circulans*)	冷藏食物	
球形芽孢杆菌(*B. sphaericus*)	冷藏食物	

续表

菌　　名	来　　源	备　　注
梭菌属(*Clostridium*)	温带土壤	
肉毒梭菌(*C. botulinum*)	冷藏食物	
矛形梭菌(*C. hastiforme*)	冷藏食物	
棒杆菌属(*Corynebacterium*)	温带土壤	0℃和25℃生长一样好
节杆菌属(*Arthrobacter*)	温带土壤、两极	
冰河节杆菌(*A. glacialis*)	北极冰层、洞穴	
短杆菌属(*Brevibacterium*)	温带土壤、海冰	
小杆短杆菌(*B. minutiferula*)	海冰	
微杆菌属(*Microbacterium*)	温带土壤	
纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)	温带土壤	
库特氏菌属(*Kurthia*)	温带土壤 冷藏食物	
佐氏库特氏菌(*K. zopfii*)	冷藏食物	
嗜冷菌属(*Psychrobacter*)		
固定嗜冷菌(*P. immobilis*)	南极	产β-内酰胺酶

四、放线菌

链霉菌属(*Streptomyces*)存在于南极土壤。诺卡氏菌属(*Nocardia*)亦存在于南极土壤。

五、酵母菌

假丝酵母菌属(*Candida*)和隐球菌属(*Cryptococcus*)存在于南极盐湖。

六、真菌

青霉菌(*Penicillium roqueforti*)在-75～-45℃能生存。

七、藻类

Chlamydomonas、*Aukistrodesmus*、*Mesotaenium*、*Raphidonema nivale*、*Chloromanas pichinchae*、*Cylindrocystis brebissonii* 均为在冰雪中发现的"冰雪藻"。

第6章　微生物菌种低温保存法概述

§6.1　微生物菌种保藏的基本原理和方法

一、基本原理

微生物菌种的保存已有一百多年的历史。从19世纪著名微生物学家柯赫(Koch)创立细菌纯培养技术开始，微生物菌种(纯种)的长期保存问题就引起微生物学家的高度重视。至今，微生物菌种的保存方法从无到有，由简单到复杂，不断更新，不断完善，现已有二十几种保存方法。尽管微生物菌种的保存方法很多，但原理却大同小异，根据研究和生产的目的，选择优良的菌种；创造干燥、低温、缺氧、避光和贫乏营养的条件，使菌种处于不能进行旺盛的新陈代谢的休眠状态；添加适宜的保护剂，控制菌种保存质量。在实际工作中，研究人员可选择适用范围广、保存期长、稳定性好、节省人力物力的方法。

二、方法

微生物菌种保存方法虽然很多(图6－1)，但从总体上分不外乎四大类：传代法、干燥法、冷冻法及冷冻干燥法，其中冷冻保存法和冷冻干燥保存法是目前公认的长期保存微生物菌种的最安全、可靠的方法。

由于微生物种类繁多，不同类别的微生物之间千差万别，其各自生长、存活所需的外界条件也各式各样，在实际工作中选择菌种的保存方法要针对不同类别微生物的各自特点，并从保存菌种的目的出发。一般来说，选择菌种保存方法应注意以下几点：

(1) 保证菌种具有较高的存活能力。菌种在保存过程中会导致存活能力降低，甚至死亡。因此，为了避免菌种丢失，选择保存

方法首先要考虑菌种的存活能力，必须保证所使用的保存方法能使菌种存活尽可能长的时间。

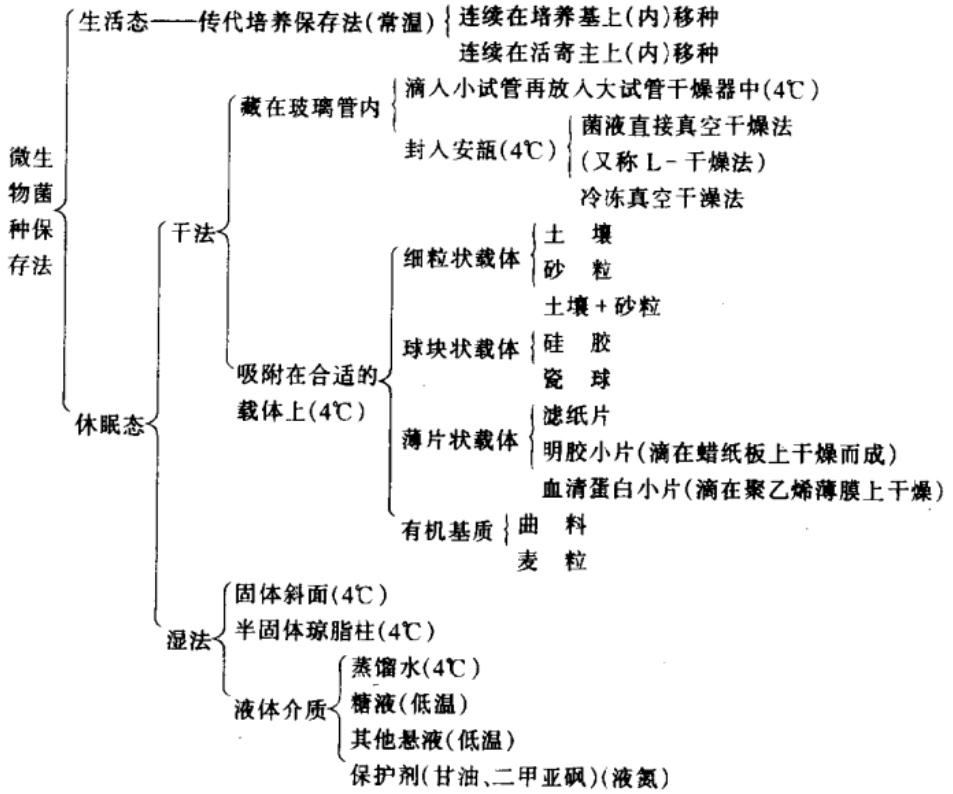


图 6-1 微生物菌种保存的基本方法

(2) 避免筛选导致的菌种细胞群体组成变化。在对菌种进行保存处理的过程中会有部分 细胞死亡，由于保存菌种起始浓度很高，这种情况容易被忽视。但随时间延长，存活细胞逐渐减少，因而有必要对菌种进行筛选，在筛选过程中有可能导致菌种性质发生变化。因此，选择保存方法需使保存菌种细胞存活数量尽量接近于起使存活细胞的数量，保持菌种细胞群体的均一性。

(3) 保持菌种的纯度。保存方法要最大限度地减少菌种被污染的机会。

(4) 避免菌种遗传性质的改变。一些菌种在科研和生产上具有重大价值，在保存过程中必须保持菌种的遗传特征不发生变化，避免保存过程中菌种发生突变或质粒丢失。

(5) 控制菌株的数量。保存菌种的数量要与保存菌种所需的

操作时间和场所相适应。

(6) 注意菌种的价值。对于价值较高的菌种,最好用两种以上的方法保存,以免菌种丢失造成重大经济损失,而对一般菌种则要考虑保存方法的费用高低。

(7) 节省费用。菌种保存涉及到人员、仪器、物资及场所等诸多方面的费用问题,要综合考虑。一些保存方法如冷冻干燥所需设备昂贵,但通过此法保存的菌种存放时间长,与传代保存法所耗费的人力费用相比并不高。

(8) 方便菌种的供应和运输。一些菌种需要有备份,以便于随时提供菌种,这些备份菌种的保存方法既要方便,又要便于运输,并且能保持菌种存活。

(9) 预见菌种的使用频率。某些菌种使用频率很高,所用的保存法要使菌种复苏容易,而且被污染的机会少。

三、操作规程

对微生物菌种进行保存时,需要遵循一定的操作规程,各专业保藏机构都有自己的一整套方法,现将 CCTCC 微生物菌种保存规程概括如下,见图 6-2。

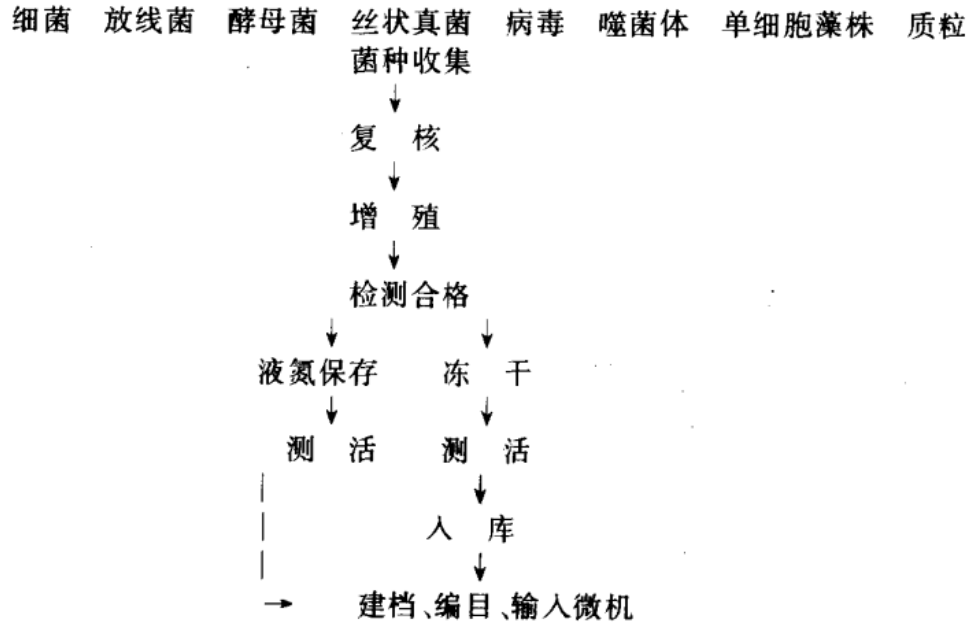


图 6-2 CCTCC 微生物菌种保存规程

§6.2 冷冻保存法

一、原理

在低温冷冻条件下，细胞的代谢活动几乎停止而处于休眠状态，菌种在这种状态下能长期保存。但这种低温冷冻条件也会对细胞造成一定的损害：一是由于脱水而使电解质浓度过高，因此，对将要冷冻保存的菌液，除特殊情况下不宜加电解质，非加不可时，也加最小量；二是由于结冰可能对细胞造成结构上的损伤，为了减少这种伤害，可适当调节冷冻速度或在细胞悬液中添加适合的保护剂。一般来讲，冷冻速度较慢时，只有菌体外的水结冰；冷冻速度较快时，细胞内也结冰，而且细胞越大，越容易产生细胞内结冰。加甘油等防冻剂可防止细胞外结冰所引起的损伤，也就是说缓慢冷冻的效果较好，而细胞种类和添加保护剂的种类和浓度的不同是影响 细胞内结冰速度的重要因素。对微生物而言，冷冻速度低于每分钟 100℃时不必要担心细胞内结冰。冷冻保存菌种的效果除与上述两方面因素有关外，菌龄、菌浓度等也影响保存效果。一般认为，对数期细胞抗冷冻能力强；菌浓度较高则菌种存活机会也增高，保存期也延长。另外，冷冻保存菌种复苏时融解速度要快，尽量避免反复冻融。

二、方法

冷冻保存菌种一般在－20℃下进行，温度越低效果越好，可分为低温冰箱法、干冰法及液氮保存法。

（一）低温冰箱法

低温冰箱保存菌种所使用温度一般为－20～－70℃。多数微生物在－20℃左右保存时效果就很好；但是，保存温度在－30℃以上时，由于低溶点混合物使细胞暴露于高盐环境而受损。况且实际贮藏时，微小的温度变化会引起溶液反复冻融而损伤细胞，不适于长期保存菌种。在更低的温度条件下保存菌种不仅保存时间长，而且还可以不必在意冷冻速度，操作非常方便。使用低温冰箱

保存菌种时要注意停电和机器故障，为了安全最好自备发电机。

（二）干冰保存法

干冰温度大致为－70℃，此法的最大优点是简单、方便，便于运输菌种；缺点是温度不稳定，而且保存过程中要考虑到二氧化碳侵入保存容器的问题，因为二氧化碳可能对一些酸敏感的菌种不利。

（三）液氮保存法

液氮保存法是将微生物于－196℃的液氮超低温保存。几乎所有的微生物都可长期冻存于液氮中，特别是对霉菌的菌丝、大多数藻类、原虫等冷冻干燥较困难的微生物的长期保存很有利。菌种保存时间的长短、存活率的高低、遗传性状的稳定程度与冻存温度相关，温度越低效果越佳。所以，在有条件的实验室，特别是长期保存微生物种子或用其他方法保存效果不佳的微生物时，多采用液氮保存。尽管冻存温度对微生物的保存效果有直接的影响，但是，其他因素诸如微生物的菌龄、菌浓度、保护剂中电解质的浓度、保护剂的浓度等也必须加以考虑，它们也不同程度地影响菌种的冻存效果。

微生物菌种冻存于液氮中，其代谢活动停止，完全处于休眠状态。所以，液氮保存不仅使菌种的存活率高，防止菌种变异，而且能延长保存时间。它是目前长期保存微生物菌种的最佳方法，已被许多菌种保藏单位和专业研究室所采用。CCTCC 用液氮保存微生物菌种和无孢子的真菌菌丝，复苏率达 95% 以上，稳定性好，安全可靠。下面介绍其操作程序，供微生物工作者选用。

（1）安瓿的准备　微生物菌种用液氮保存受容器的限制，一般仅保存少量的种子，安瓿数极少（2～5 个/株），所以常用无菌塑料冷冻管冻存。如大批量保存，可选用 1.2ml 玻璃安瓿，用常法清洗，打标签（菌名、批号、日期），包扎安瓿，于 180℃ 干热灭菌 4 小时，或 121℃ 高压灭菌 35 分钟，烘干备用。

（2）集菌　待冻存微生物在适宜的培养条件下培养到生长的最佳状态（细菌培养到对数生长后期，病毒达到感染宿主的高峰），

用常法收集菌体。

(3) 保护剂配制　选择优质的甘油或二甲亚砜(DMSO)作为冻存保护剂。甘油于121℃高压灭菌15分钟,分装于贮备管,保存于2～8℃,使用时与菌悬液等量混合即可。二甲亚砜以过滤除菌的方法制备为妥,使用时以5%～10%的浓度为佳。

(4) 分装安瓿(冷冻管)　待冻存菌经集菌后悬浮于磷酸缓冲液中,调整浓度至10^7～10^8/ml,加入5%～10%的保护剂,充分混匀,加0.5～1.0ml菌液到安瓿中。拧紧塑料安瓿盖子,玻璃安瓿火焰封口、检查密封情况。

(5) 预冻

① 程控降温预冻:CCTCC所采用的预冻在程控降温仪中进行,通常以－0.1℃/min速率降至－40℃,或以－10.0℃/min降至－90℃以下。如冻存藻类、原生动物或某些特殊的微生物,可适当调整降温速率。

② 机械冰箱预冻:无程控降温仪的实验室可采用机械冰箱预冻,将安瓿贮于4℃ 30分钟、－30℃ 30分钟、－70℃至少1.0小时,然后转入液氮气相或液相贮存。

(6) 贮存　液氮容器内气相温度一般在－130℃以下,液相为－196℃。微生物菌种长期贮存可存放于液氮液相,短期贮存则存放于气相,这样存取方便。

(7) 复苏　将安瓿于37～40℃水浴快速解冻,接种菌液至适宜的生长培养基中培养。冻存过的菌液一次用完,安瓿反复冻融将加速微生物的死亡,不宜采用。

(8) 冻存记录　记录对液氮贮存微生物菌种尤为重要。存放安瓿后,一定要认真记录存放位置、安瓿数量等数据。

(9) 注意事项

① 由于液氮不断蒸发,必须经常补充液氮,否则温度上升会导致菌种死亡。

② 制备液氮的仪器贵重,此方法费用较高,而且占用空间较大,运输不方便,应视条件选用。

③ 用玻璃仪器保存菌种时，如果容器密封不好，液氮可渗入到容器内，当温度升高时，液氮迅速蒸发可能导致爆炸，采用液氮蒸气保存可避免这一现象；但由于液氮气相温度（－140℃）高于液相温度（－196℃），效果不如后者。

§6.3 冷冻干燥保存法

一、原理

冷冻干燥是一种保存细菌、病毒、酵母、产孢子真菌及其他微生物的有效方法，原理很简单。首先使微生物冷冻，然后在减压下利用升华现象除去水分，使微生物处于干燥、缺氧状态，其生理活动停止。安瓿贮于低温条件下，能长期保存，尤其是有利于微生物菌种的取存、运输、销售、交换。冷冻干燥法保存菌种需要冷冻干燥机，常用的冻干机有两种类型：离心式和箱式。

采用离心式冻干机冷冻干燥菌种时，以冷冻和真空来减少菌悬液的潜热。第一次干燥阶段，通过离心增加悬液暴露的表面积并避免溶于菌悬液中的气体外逸时产生泡沫。在第二次干燥阶段，采用歧管进一步以真空除去剩余的水分。安瓿在真空或充入惰性气体的状态下密封、保存。利用箱式冻干机时，菌悬液在真空干燥之前要预冻，样品装在小玻璃瓶中，不需以歧管进行二次干燥。总体而言，离心式冻干法比箱式冻干法应用得更为广泛。其优点之一是可在安瓿中填装棉花，避免交叉污染；也可以防止打开安瓿时，保存菌种扩散至周围环境。优点之二是，安瓿密封性能较以橡皮塞封口的玻璃小瓶好，保存时间更长。

二、方法

冷冻干燥的方法很多，各种微生物菌种保藏手册、专著中均有论述，下面介绍的是 CCTCC 常用的方法。

（一）安瓿准备

（1）选料清洗　CCTCC 选用优质的硬质玻璃（95＃料）制备安瓿管（武汉大学玻璃厂）。使用前，用稀铬酸洗液浸泡 2～3 小

时，用自来水反复清洗，用双蒸水浸泡过夜，沥水，烘干备用。

（2）打标签　标签应标明：①微生物属名、种名；②编号；③冻干日期。

（3）灭菌　安瓿加标签，塞入适量的脱脂棉，用牛皮纸包扎，于121℃高压灭菌30分钟，37℃过夜，次日再灭菌30分钟，60～80℃烘干备用。

（二）保护剂的配制

（1）脱脂牛奶　称取脱脂牛奶粉（Skim milk，Difco 0023）20g，溶于100ml双蒸水中，分装小试管（5ml/支），于116℃高压灭菌20分钟。随机取样，接种0.2ml于LB培养基，培养过夜，作无菌检查，阴性结果均可使用。

（2）糖类、血清及对高温敏感的保护剂　含糖类物质、血清等保护剂对热敏感，高压灭菌容易变性，失去低温保护剂作用，所以采用0.22μm的滤器（Millipore Co. USA）过滤除菌。保护剂的使用浓度视不同菌种的需要而定。

（三）菌悬液制备

（1）菌龄的选择　菌龄的长短影响冻干的效果。一般而言，产孢子菌种以冻干保存孢子为宜，不产孢子菌种则以对数生长后期的菌体最佳。适时收集菌体可提高冻干后的存活率。

（2）集菌　按常规收集菌体（或孢子），用无菌生理盐水或磷酸缓冲液（0.1mol/L，pH7.2）洗涤，除去残余的培养基成分及代谢产物，3500r/min离心，弃上清液，收集菌体备用。

（3）悬浮菌体　将收集的菌体或孢子用20%（W/V）的无菌脱脂牛奶或其他保护剂悬浮，要充分吸打菌体，制成均匀的菌体或单孢子悬浮液，浓度为10^8～10^9/ml。

（四）分装安瓿

用无菌操作分装菌液到安瓿中，每支0.2ml，分装采用巴氏吸管或微量进样器。操作尽可能快，减少菌液在室温的存放时间。如样品太多，分装后的安瓿暂贮于4℃冰箱。

（五）预冻

将样品安瓿置于4℃30分钟，-30℃ 30分钟，-70℃2～3小时。延长-70℃的预冻时间不会影响冻干存活率，如不能及时冻干，可暂贮于-70℃。

(六) 冻干

CCTCC采用英国爱德华公司冻干机冻干菌种。该机操作方便，冻干效果好，一次可冻300支安瓿。常规冻干条件为冻室温度：-50℃，真空度为0.02Mbr，时间为8～12小时。

(七) 封口(第二次真空封口)

菌种安瓿冻干后，取出进行二次真空封口。封口前后的安瓿用真空检测计检测真空度，确保安瓿内处于真空状态。

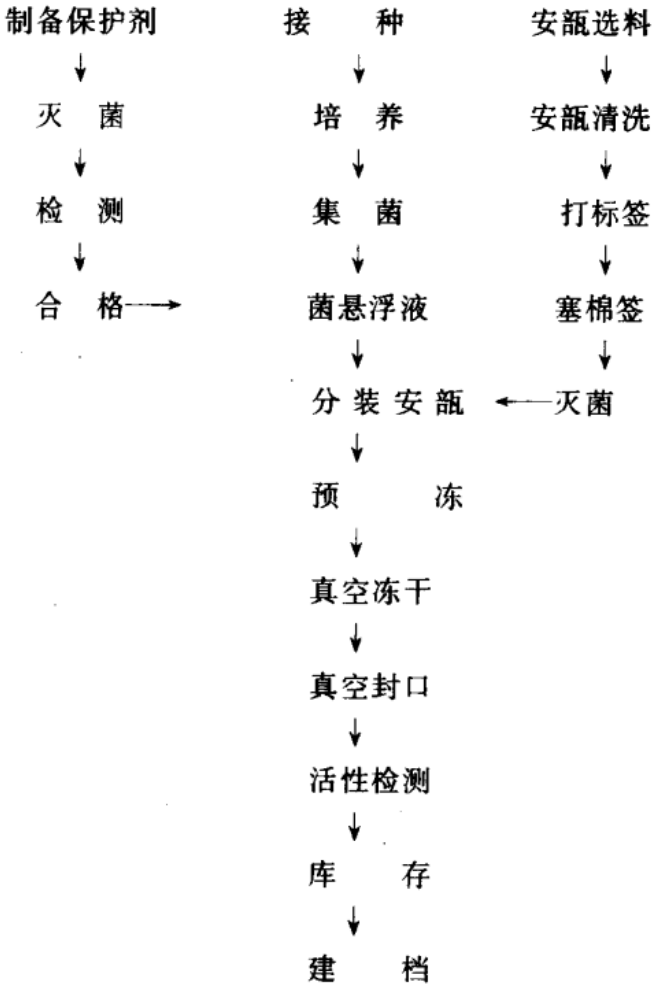


图6-5　CCTCC微生物菌种冻干保存操作程序

（八）活性检测

菌种冻干后抽样，用液体培养基作生长测定，观察菌体形态、产孢子情况；用固体琼脂平板计数法测定活菌数。

（九）贮存

菌种安瓿贮存于4℃冷库，并定期抽样检查菌种的存活性、某些遗传特征及生物学特性的稳定性。

（十）建档

将库存菌种建立贮存档案，并将有关数据输入微机数据库，由专人管理。微生物冻干保存的操作程序见图6－5。

§6.4 菌种保存的质量控制及效果评估

一、微生物菌种保存的质量控制

与动物细胞保存质量控制相比，微生物菌种保存的质量控制方法要简单得多，检测项目也比较少，普通实验室均可做到。其常规方法是检测菌种存活性和纯度，对每批号的冷冻或冻干菌种，此两项常规检测是必做的。大批量的安瓿制备，要检测数支安瓿，通常每批号中按1/50的比例抽样检测存活性、纯度、特性试验和含水量等项目。

（一）活性检测

对细菌和某些真菌，采用稀释平板菌落计数法检测存活率；对病毒、噬菌体，则用空斑检测法测定存活性；对其他微生物菌种，选用适宜的方法检测活性。方法的选择以能正确评估菌种存活率为基础。ATCC选用一种简单的方法检测菌种的存活性，其操作方法如下：将冻干安瓿中的菌种用0.3～0.5ml培养液复水（冷冻安瓿于37℃水浴解冻，直接接种），转移菌悬液至装有5～6ml培养液的试管中，充分混匀。吸0.1ml菌液在琼脂平板边缘作三点式滴样接种，倾斜平板，让菌液自动流过琼脂平板表面，形成三条均匀的接种菌带，适温培养接种平板。当平板长出菌落后，对每条菌带进行评估。生长带低于100个菌落的菌种批号被认为是不合

格，应重新制备保存批号。

（二）纯度检测

任何一批号的菌种都要测定其纯度，证明确实无污染源存在后，方可长期贮存。细菌和某些真菌可通过划线分离法观察菌落形态，纯的培养物菌落形态应是一致的。异常菌落的出现，可被怀疑有污染源存在，重新取样划线，比较分析结果，一旦确证污染批号，所有的安瓿经高压灭菌，废弃，重新制备保存批号。有时也可用选择培养基来检测污染的存在。ATCC 将待检的真菌样品接种到含 0.1% 酵母浸汁的营养肉汤培养基中，以检测细菌的污染。

（三）特性试验

很多微生物菌种都具有某种生物学特性或遗传标记，如抗药性、致病性、营养缺陷型、特异酶活性、特殊代谢产物等。这些特性的检测试验很难常规进行，只有根据需要选择进行。特别是当菌种具有的某种特性决定其应用价值时，在保存过程中适时检测是至关重要的，否则就失去了保存的意义。

（四）含水量测定

冷冻干燥法保存微生物菌种时，含水量与贮存效果密切相关。含水量在 1% ～3% 范围内，一般对贮存效果影响不大；若超过 5%，安瓿贮存在温度较高的条件下，菌种存活率显著下降。所以菌种采用冻干保存时，通常要测定冻干菌种的含水量。含水量的测定有失重法、卡尔－费希尔法。失重法简单、方便，比较适用，现介绍如下。

取冻干的菌种安瓿数支，精确称重，放于盛有 P_2O_5 的真空干燥器中，维持 60℃ 干燥至恒重；或将干燥的制品保持真空度 133322Pa 干燥致恒重；也可将样品置 105℃ 烘箱中烘至恒重，含水量按下式计算：

$$\text{菌种含水量}(\%)=\frac{\text{失去的重量}}{\text{菌种样品重量}}\times 100$$

（五）质量控制规范化管理

质量控制还涉及许多其他项目，这些项目要在保存制备过程

的不同阶段进行，因此，详细的实验记录和规范管理尤为重要。像ATCC、CCTCC这样专业化的菌种保存机构，都设计了一系列的记录表格，用于菌种保存的质量控制，形成规范化的管理。有时检测的几个程序由不同的操作者负责完成，只要每人按程序填写记录表格，最终可形成完整的检测结果记录，供统一分析。记录标准化的优点还在于简单明确，省去操作者的记录时间，避免某种繁杂的记录描述，在统一分析时一目了然。下面列出一些常用的记录表格，供参考。

(1) 增殖培养记录

① 培养物：属种名_____，编号_____，批号_____，危险级别_____。

② 培养基：种类_____，批号_____，固体或液体_____。

③ 培养条件：温度_____℃，振摇_____，静止_____。

④ 传代培养：容器种类_____，容器数量_____，培养基加量_____，总体积(ml)_____。

⑤ 培养状况：培养时间(h)_____，pH变化_____，菌体混浊度或菌苔形成_____。

⑥ 工作区域无菌空气的检测：各类微生物在平板上生长数(个)_____，克隆形成_____。

操作者签名_____

日期_____

(2) 活性检测记录

① 培养物：属种名_____，编号_____，批号_____，危险级别_____，检测安瓿数_____，稀释培养基_____。

② 保存前的计数：活细胞数/ml _____，接种培养基_____，接种量_____，批号_____，菌体生长情况_____，合格_____，不合格_____。

③ 保存后的计数：活细胞数/ml _____，接种培养基_____，接种量_____，批号_____，菌体生长情况_____，合格_____，不合格_____。

操作者签名_____

日期_____

(3) 纯度测定记录

① 培养物:属种名_____,编号_____,批号_____,安瓿数_____,危险级别_____。

② 保存前的计数:克隆形态_____,革兰氏染色反应_____,细胞形态_____,异常克隆_____。

③ 保存后的计数:克隆形态_____,革兰氏染色反应_____,细胞形态_____,异常克隆_____。

操作者签名_____

日期_____

(4) 特性试验

① 培养物:属种名_____,编号_____,批号_____,安瓿数_____,危险级别_____。

② 检测项目:抗药性_____,致病性_____,营养谱_____,特异酶活性_____,特殊代谢产物_____,其他_____。

③ 结果:

a._____ d._____

b._____ e._____

c._____ f._____ g._____

操作者签名_____

日期_____

(5) 冻存记录

① 培养物:属种名_____,编号_____,危险级别_____。

② 安瓿制备:批号_____,安瓿总数_____,玻璃安瓿_____,塑料冷冻管_____。

③ 安瓿分装:活细胞数/ml _____, 分装菌液(ml)/支_____,安瓿分装总数_____,玻璃安瓿封口_____,检漏情况_____。

④ 预冻: 安瓿放_____℃_____h。

安瓿于_____℃/min 到_____℃_____℃/min 到_____℃。贮存:安瓿贮放-70℃_____层_____格_____号架子。

安瓿贮放液氮_____区_____号吊桶_____号安瓿夹。

操作者签名_____

日期_____

(6) 冻干记录

① 培养物:属种名_____,编号_____,危险级别_____。

② 安瓿制备:批号_____,安瓿数_____,灭菌_____℃_____h(min)。

③ 安瓿分装:活细胞数/ml _____,保护剂_____,分装安瓿数_____,封口检漏_____。

④ 预冻:安瓿放_____℃ _____h(min) _____℃ _____h(min)转移至_____℃ _____h(min)。

⑤ 冻干:冻干机温度(℃)_____真空度(mbr)_____冻干时间_____h(min)。

⑥ 含水量:检测方法_____,含水量(%)_____。

⑦ 二次真空封口:真空度(mbr)_____封口情况_____。

⑧ 贮存:安瓿贮放_____℃。

操作者签名_____

日期_____

二、微生物菌种保存效果的评估

事物总是一分为二,无绝对可言。微生物是活的有机体,除了保存方法本身的问题外,还涉及微生物的菌龄、浓度、保护剂诸多因素,加之微生物的多样性,决定了菌种保存方法的多元化。所以,任何一种保存方法不可能对所有的微生物菌种都是有效的。例如,冷冻干燥法广泛用于多种微生物菌种保存,特别是对细菌保存效果甚佳,而对无孢子丝状真菌的保存效果就不理想。液氮保存法几乎对各种微生物都有效,但要求特殊液氮容器,由专人严格管理,况且,液氮的来源受一定条件的限制,广泛应用也不现实。作者认为,对于条件较差的实验室或基层单位,因地制宜地开展微生物菌种保存也是完全可行的。如薛明清等采用简易干燥滤纸片法于4℃保存24株痢疾杆菌、4株金黄色葡萄球菌和1株大肠杆菌,存活期在2年以上。颜进则选用鸡蛋斜面接种淋球菌、葡萄球菌、痢疾杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、炭疽杆菌、粘质沙雷氏菌、肺炎克雷伯氏菌、黄色微球菌和白喉杆菌,37℃培养24~48小时后,取出将棉塞换成灭菌的橡皮塞,置4℃保存。葡萄球菌和肠道菌可

保存 3 年以上;淋球菌和白喉杆菌保存半年以上;溶血性链球菌和肺炎球菌至少可保存 2 个月。有人将霍乱弧菌用 0.01mol/L、pH8.0 PBS稀释的碱性蛋白胨水悬浮,于 22～28℃保存,可存活 2～3 年以上;而在 4～8℃中保存仅存活 15 天。这些方法简单可行,容易做到。当然,假如分离或鉴定了新的微生物菌株,或者从国外索取新的培养物,你最好送至专业保存机构长期保存,这对深入、持久地进行研究是非常重要的。

第7章　各类微生物菌种的低温保存

§7.1　细菌的低温保存

一、冷冻干燥保存法(英国 NCTC 法)

(一) 保护剂配制

(1) 肌醇血清:肌醇 5g,马血清 100ml,过滤除菌。

(2) 肌醇肉汤:Oxoid 营养肉汤干粉 2.5g,肌醇 5g,蒸馏水 100ml,121℃ 灭菌 15 分钟。

(二) 菌悬液制备

按常规方法接种,培养至对数后期,加入适量保护剂,制备成浓度约为 1×10^8 个/ml 菌悬液。

(三) 安瓿的准备

选取中性玻璃安瓿管(100mm×7.0~7.5mm),用 2% 盐酸浸泡过夜,用自来水和蒸馏水洗净、烘干。在 5mm×30mm 标签纸上做好标记,装入管中,塞入脱脂棉,121℃、15 分钟灭菌二次。

(四) 分装安瓿

用灭菌巴氏吸管采取无菌操作将 0.1~0.2ml 菌悬液加入灭菌安瓿管内。

(五) 第一次干燥

将分装好的安瓿管在离心状态下冷冻低压蒸发水分,时间至少持续 3 小时。

(六) 安瓿管压缩

迅速将第一次干燥后的安瓿管进行压缩,将棉塞上部的玻管用火焰加热,拉细至直径约为 2mm。

(七) 二次干燥

用 P_2O_5 作为干燥剂除去安瓿管中的剩余水分，使最终残留水分约为 1%。

（八）封口

利用歧管，在真空或通入惰性气体状态下，在安瓿管拉细处用火焰加热、封口，用真空检测计检查真空度。

（九）保存

采用此法处理的大部分菌种在室温条件下于黑暗处保存效果很好，某些菌种需要在低温（4℃）条件下保存。NCTC 对用本方法处理的细菌菌种保藏的效果进行了调查，表 7－1 中所列的菌种用此法保藏可存活 1～35 年。研究表明，也有一些菌种不适于用此法保存，见表 7－2。

表 7－1　　NCTC 冻干法成功保存的部分细菌

属　　名	种的数量	菌株数量	保存时间（年）
无色杆菌（*Achromobacter*）	6	9	20
不动杆菌（*Acinetobacter*）	2	10	25
放线芽孢杆菌（*Actinobacillus*）	3	19	30
马杜拉放线菌（*Actinomadura*）	3	8	20
放线菌（*Actinomyces*）	4	13	35
气单胞菌（*Aeromonas*）	4	9	20
产碱杆菌（*Alcaligenes*）	3	7	20
芽孢杆菌（*Bacillus*）	27	70	35
类杆菌（*Bacteroides*）	5	12	20
博德特氏杆菌（*Bordetella*）	3	26	25
短杆菌（*Brevibacterium*）	2	4	10
布鲁氏菌（*Brucella*）	5	32	30
丁酸杆菌（*Butyribacterium*）	1	1	15
弯曲杆菌（*Campylobacter*）	13	43	15
心杆菌（*Cardiobacterium*）	1	3	10

续表

属　　名	种的数量	菌株数量	保存时间(年)
纤维单胞菌(*Cellulomonas*)	2	2	20
柠檬杆菌(*Citrobacter*)	2	11	30
梭状芽胞杆菌(*Clostridium*)	18	73	30
棒状杆菌(*Corynebacterium*)	14	72	35
噬细胞菌(*Cytophaga*)	1	1	10
噬皮菌(*Dermatophilus*)	1	1	10
爱德华氏菌(*Edwardsiella*)	3	5	20
肠杆菌(*Enterobacter*)	8	20	35
欧文氏肠杆菌(*Erwinia*)	1	4	20
丹毒丝菌(*Erysipelothrix*)	1	8	25
埃希氏菌(*Escherichia*)	3	6	35
黄杆菌(*Flavobacterium*)	11	26	30
费朗西氏菌(*Francisella*)	1	1	10
梭杆菌(*Fusobacterium*)	6	10	15
孪生球菌(*Gemella*)	1	3	15
嗜血杆菌(*Haermophilus*)	12	25	20
哈夫尼菌(*Hafnia*)	1	8	35
克雷白氏杆菌(*Klebsiella*)	6	57	30
克鲁维氏菌(*Kluyvera*)	2	2	15
库特氏菌(*Kurthia*)	2	3	10
乳芽孢杆菌(*Lactobacillus*)	3	6	30
明串珠菌(*Leuconostoc*)	1	1	15
利斯特氏菌(*Listeria*)	6	19	20
微球菌(*Micrococccus*)	3	23	35
莫拉氏菌(*Moraxella*)	12	25	25
分枝杆菌(*Mycobacterium*)	12	49	35
奈瑟氏球菌(*Neisseria*)	9	41	30
诺卡氏菌(*Nocardia*)	5	10	25
厄氏菌(*Oerskovia*)	1	1	1

续表

属　　名	种的数量	菌株数量	保存时间(年)
巴斯德氏菌(*Pasteurella*)	5	28	30
片球菌(*Pediococcus*)	1	2	10
消化球菌(*Peptococcus*)	7	8	10
消化链球菌(*Peptostreptococcus*)	3	3	5
邻单胞菌(*Plesiomonas*)	1	3	25
丙酸杆菌(*Propionibacterium*)	4	6	10
变形菌(*Proteus*)	4	22	30
普罗威登斯菌(*Providencia*)	3	11	30
假单胞菌(*Pseudomonas*)	12	31	30
枝杆菌(*Ramibacterium*)	1	1	10
红球菌(*Rhodococcus*)	5	14	35
罗氏菌(*Rothia*)	2	3	15
沙门氏菌(*Salmonella*)	–	131	35
八叠球菌(*Sarcina*)	1	1	15
沙雷氏菌(*Serratia*)	6	18	30
志贺氏菌(*Shigella*)	4	63	35
西蒙斯氏菌(*Simonsiella*)	1	1	10
葡萄球菌(*Staphylococcus*)	3	48	35
链杆菌(*Streptobacillus*)	1	8	10
链球菌(*Streptococcus*)	12	75	35
链霉菌(*Streptomyces*)	5	9	25
热放线菌(*Thermoactinomyces*)	1	1	15
韦荣氏球菌(*Veillonella*)	8	9	5
弧　菌(*Vibrio*)	5	23	30
耶尔森氏菌(*Yersinia*)	2	20	25
动胶菌(*Zoogloea*)	1	1	10

表 7－2　　不适于用 NCTC 冻干法保存的细菌

产黑色素类杆菌(*Bacteroides melaninagenicus*)	颊纤毛菌(*Leptotrichia buccalis*)
肉素梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)	田鼠分枝杆菌(*Mycobacterium microti*)
气肿疽梭状芽孢杆菌(*C. chauvoei*)	淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)
诺维氏梭状芽孢杆菌(*C. novyi*)	类味梭状芽孢杆菌(*C. scatologenes*)
犬嗜血杆菌(*Haemophilus canis*)	猪嗜血杆菌(*H. suis*)

二、液氮保存法

液氮法是保存细菌的一种常用方法，中国科学院微生物所周宇光对以 10% 甘油水溶液为保护剂，采用液氮低温保存 39 属 128 种 1060 株细菌的效果进行了检测，结果表明，1060 株细菌经 10 年(部分 7 年)的液氮法保存后，保持活力的有 1037 株，存活率为 97.83%，仅有少数细菌(特别是弧菌属)死亡，见表 7－3。

表 7－3　39 属部分细菌经液氮超低温冻结保藏 7～10 年的结果

微生物名称	保藏 7 年(株)	保藏 10 年(株)
醋酸化醋杆菌(*Acetobacter aceti*)	3	
产黑醋杆菌(*A. melanogenum*)	1	11(1)
半氧化醋杆菌(*A. mesoxydans*)	1	1
巴斯德氏醋杆菌(*A. pasteurianus*)	1	
恶臭醋杆菌(*A. rancens*)	9	2
玫瑰色醋杆菌(*A. roseum*)	1	
弱氧化醋杆菌(*A. suboxydans*)	10	8
无色杆菌(*Achromobacter diquefacieus*)		2
无色杆菌(*A. rerosis*)	1	1
产气气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)	1	1
嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)		1
放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)		1

续表

微生物名称	保藏7年(株)	保藏10年(株)
粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)	1	3
石蜡节杆菌(*Arthrobacter paraffineus*)		1
简单节杆菌(*A. simplex*)	1	3
灵活固氮杆菌(*Azotobacter agilis*)		2
圆褐固氮杆菌(*A. chroococcum*)	3	9
棕色固氮杆菌(*A. vinelandii*)	2	5
蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)	25	15
环状芽孢杆菌(*B. circulans*)		3
凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)		1
弥漫芽孢杆菌(*B. diffusus*)		1
强固芽孢杆菌(*B. firmus*)		1
幼虫芽孢杆菌(*B. larvae*)	1	1
侧孢芽孢杆菌(*B. laterosporus*)		1
地衣形芽孢杆菌(*B. licheniformis*)	2	23
软化芽孢杆菌(*B. macerans*)	6	
巨大芽孢杆菌(*B. megatherium*)	3	8
胶质芽孢杆菌(*B. mucilaginosus*)		4
多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)	9	8(1)
尘埃芽孢杆菌(*B. pulvifaciens*)		2
短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)	4	13
球形芽孢杆菌(*B. sphacricus*)	8	18
嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)		1
枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)	73	90
苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)	4	76
产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)	3	41
黄色短杆菌(*B. flavum*)	3	41
产黄纤维单胞菌(*Cellulomonas flavigena*)		1
异样纤维单胞菌(*C. varians*)		1
弗劳地氏柠檬杆菌(*Citrobacter freundii*)		1
钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*)	1	3
谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*)		1
北京棒状杆菌(*C. pekinensis*)	4	3

续表

微生物名称	保藏7年(株)	保藏10年(株)
假白喉棒状杆菌(*C. pseudodiphtheriticum*)	1	
嗜热棒状杆菌(*C. thermophilum*)		1
阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)		2
软腐病欧文氏杆菌(*Erwinia aroideae*)	1	
胡萝卜欧文氏杆菌(*E. carotovora*)		1
噬夏孢欧文氏杆菌(*E. uredovora*)		1
大肠杆菌(*Escherichia coli*)	9	35
黄杆菌(*Flavobacterium antheracidum*)		1
蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)		1
嗜酸乳芽孢杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)	3	
短小乳芽孢杆菌(*L. brevis*)	3	
布启里氏乳芽孢杆菌(*L. buchneri*)	3	
干酪乳芽孢杆菌(*L. casei*)	15(1)	
纤维二糖乳芽孢杆菌(*L. cellobiosus*)	1	
嗜粪乳芽孢杆菌(*L. coprophilus*)	1	
发酵乳芽孢杆菌(*L. fermentum*)	1	
乳酸乳芽孢杆菌(*L. lactis*)	1	
莱希曼氏乳芽孢杆菌(*L. leichmannii*)	2	
植物乳芽孢杆菌(*L. plantarum*)	17	2
变草绿乳芽孢杆菌(*L. viridescens*)	1	
葡聚糖明串珠菌(*Leuconostoc dextranicum*)	1	
肠系膜明串珠菌(*L. mesenteroides*)	4	
金黄色微球菌(*Micrococcus aureus*)	1	
溶壁微球菌(*M. lysodeikticus*)	2	
耐辐射微球菌(*M. radiodurans*)	1	
偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuium*)	2	
齿垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)	1	
结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)		1
啤酒片球菌(*Pediococcus cerevisiae*)	1	
肺炎球菌(*Pneumococcus sp.*)		1
普通变形菌(*Proteurs vulgaris*)	1	1
铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)	3	15

续表

微生物名称	保藏7年(株)	保藏10年(株)
燕麦假单胞菌(*P. avenae*)		1
凸形假单胞菌(*P. convexa*)	2	1
荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)	7	2
膝状假单胞菌(*P. geniculata*)	1	1
食油假单胞菌(*P. oleovorans*)		1
假鼻疽假单胞菌(*P. pseudomallei*)	1	
恶臭假单胞菌(*P. putida*)	1	1
狗尾草假单胞菌(*P. setariae*)		1
紫云英根瘤菌(*Rhizobium astragali*)	2	8
日本根瘤菌(*R. japonicum*)		7
豆科根瘤菌(*R. leguminosarum*)	3	14
羽扇根瘤菌(*R. lupini*)		2
苜蓿根瘤菌(*R. meliloti*)	1	9
菜豆根瘤菌(*R. phaseoli*)		3
三叶草根瘤菌(*R. trifolii*)	4	3
沙门氏菌(*Salmonella sp.*)		1
黄色八叠球菌(*Sarcina flava*)	1	
藤黄八叠球菌(*S. lutea*)	2	3
亚黄八叠球菌(*S. subflava*)	2	2
尿素八叠球菌(*S. ureae*)	1	
粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)		2
白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)	2	
金黄色根瘤菌(*S. aureus*)	1	6
奶油色链球菌(*Streptococcus cremoris*)	1	
粪链球菌(*S. faecalis*)	6	2
乳链球菌(*S. lactis*)	1	2
柞蚕链球菌(*S. pernyi*)		5
肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)		1
副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)		3
美观弧菌(*V. splendidus*)		3(3)
稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)		2
未定名菌种	15(6)	145

注:括号内数字表示死亡的菌株数.

三、玻璃珠冷冻保存法

由于低温冰箱的广泛应用，用低温冰箱冷冻保藏微生物菌种十分方便；但在实际操作过程中，如果某些菌种需要经常使用，反复冻融会使细胞受损伤，虽然可以通过多管分装解决这个问题，但占用空间较大。Jones 等采用玻璃珠冷冻法保存菌种，不仅占用空间小，更重要的是，使用冻藏菌种时不必将全部样品融化，避免了因反复冻融对细胞造成伤害。

（一）玻璃珠的准备

将直径约 2mm 的玻璃珠用去污剂洗净，然后用稀 HCl 浸泡，用水清洗，于 45℃烘干，将 20～30 粒玻璃珠装入容积约 2ml 的小瓶，盖好盖子后于 121℃灭菌 15 分钟。

（二）标记

在小瓶上标上菌名、菌号、培养基成分及其有关标记。

（三）菌悬液制备

将菌种接于其最适的非选择性培养基上培养后，加入适量悬浮液（最适培养基加 15% 甘油）制成菌悬液。

（四）分装

采用无菌操作将菌悬液加入已灭菌的装有玻璃珠的小瓶，吹吸几次排除气泡，当所有的玻璃珠都被润湿后，将菌悬液吸出，过多的菌悬液会导致冻藏后玻璃珠难以取出。

（五）保藏

将分装好的小瓶置于低温冰箱（－60～－80℃）保存。

（六）玻璃珠的取出及菌种活性检测

采用无菌操作，用无菌接种铲由小瓶中取出一粒玻璃珠置于适宜的固体培养基上，室温放置一段时间后，用接种铲或接种环使玻璃珠在培养基表面滚动摩擦，使菌种接于培养基上，于适宜条件下培养，并将装有玻璃珠小瓶迅速放回原处。

研究表明，放线芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌、嗜血杆菌、奈瑟氏菌、巴斯德氏菌、耶尔森氏菌、弧菌及粪杆菌等属中的许多种均能成功地用此法保存。另外，一些肠杆菌、葡萄球菌、微球菌、乳芽孢

杆菌、链球菌、棒状细菌、嗜碱菌、嗜盐菌及丙酸细菌也可以用此法保存。

四、厌氧细菌的低温保存

由于氧气对厌氧菌具有毒害作用，保存厌氧菌（特别是专性厌氧菌）时，从培养基的配制、接种、培养到保存都要在通 CO_2 或 N_2 条件下进行。下面介绍厌氧细菌的冷冻保存法和冻干法。

（一）冷冻保存法

厌氧细菌的培养方法在有关文献中有详细记录，在此不再赘述。培养保存厌氧细菌的培养基种类很多，表 7－4 及表 7－5 所列的是常用来冷冻保存厌氧细菌的 MM10 培养基。在配制 MM10 培养基时，首先将除 L－盐酸半胱氨酸及碳酸钠之外的成分按表 7－4 的比例溶于玻璃蒸馏水，用 1mol/L 的 NaOH 将 pH 调到 6.8，装入三角瓶，加棉塞，于 121℃ 灭菌 15 分钟，之后趁热将无菌细管伸入三角瓶，通无菌 CO_2 吹培养基表面（也用同样的方法处理已灭菌的 Na_2CO_3 溶液），待培养基温度降到 50℃ 以下时，加入已灭菌的 L－盐酸半胱氨酸溶液及 Na_2CO_3 溶液，混匀后再将细管插入培养基底部通入 CO_2，30 分钟后分装备用。

表 7－4　　MM10 培养基成分（1）

纤维二糖	1.0g/L
麦芽糖	1.0g/L
葡萄糖	1.0g/L
可溶性淀粉	1.0g/L
酵母膏	2.0g/L
胰蛋酶解酪蛋白	2.0g/L
无机盐溶液Ⅰ	75ml/L
无机盐溶液Ⅱ	75ml/L
VFA 混合溶液	3.1ml/L
氯高铁血红素溶液	10ml/L
Resazurin 溶液	1.0ml/L
	pH 6.8
2.5%（W/V）L－盐酸半胱氨酸	20ml/L
8%（W/V）Na_2CO_3	50ml/L

表 7-5　　MM10 培养基成分(2)

无机盐溶液Ⅰ：6.0g K_2HPO_4 溶于 1L 玻璃蒸馏水，4℃保存

无机盐溶液Ⅱ：1.2g NaCl、12g $(NH_4)_2SO_4$、6g K_2HPO_4、1.2g $CaCl_2$、2.5g $MgSO_4.7H_2O$ 溶于 1L 玻璃蒸馏水，4℃保存

氯高铁血红素溶液：10mg 氯高血红素溶于 1mol/L NaOH，用玻璃蒸馏水稀释至 100ml，4℃保存

VFA 混合溶液：17ml 乙酸、6ml 丙酸、4ml n-丁酸、1ml 异丁酸、1ml DL-α-甲基-n-丁酸、1ml n-戊酸、1ml 异戊酸、1g 苯乙酸，混匀后于 4℃保存。

Resazurin 溶液：0.1%(W/V) resaxurin 溶于无菌蒸馏水，4℃保存

在 MM10 琼脂培养基斜面上生长良好的厌氧细菌，可在 -80℃的条件下冷冻保存 3 个月。

(二) 冷冻干燥保存

(1) 安瓿准备　按前述方法对安瓿进行清洗、标记。

(2) 菌悬液制备及分装　将在液体 MM10 培养基中培养的厌氧菌离心收集，在通 CO_2 的情况下加入适量悬浮液(7.5%葡萄糖溶于马血清，过滤除菌)制成菌悬液，立即分装至安瓿管。从开始分装菌悬液到进行冻干操作，时间不要超过 30 分钟。

(3) 第一次干燥　方法同前，常用的 P_2O_5、甲醇、干冰等冻干试剂对厌氧菌也适用。

(4) 安瓿管压缩、二次干燥及封口　操作步骤基本同前，在真空或通入惰性气体的情况下封口。

(5) 保存　将安瓿于 2～10℃黑暗处保存。采用此方法保存的一些厌氧菌，10 年后仍保持很高活性，22 年后还能存活。

§7.2　丝状真菌的低温保存

一、冷冻法

(一) 斜面-20℃冷冻保存

一些丝状真菌(如曲霉、青霉等)斜面培养物在 -20℃条件下

保存可存活 4～5 年;但也有一些真菌不适于用此法保存,如轮枝梳霉、一些卵菌及水生霉菌等。

一般而言,用此法保存真菌需加入保护剂(如 10% 甘油);但也有些菌种在保存过程中加入保护剂反而效果不佳。这可能是由于这些真菌细胞在甘油存在的情况下,-20℃ 也不冻结,生化反应仍能继续进行;另外,低渗溶液也会对细胞造成不利的影响。因此,在实际操作过程中,对不同的菌种要采取不同的方法。

(二) 液氮保存法

用液氮或液氮蒸气保存真菌的效果很好,IMI 用此法保存的 5500 株菌中有 5114 株可存活 22 年;但有些真菌很难用此法保存,原因可能是在处理过程中对真菌造成了机械性损伤。降温速度对真菌的存活率具有重要影响。由于不同的菌种的最佳降温速度不一样,因此,在进行冷冻保存处理之前,要通过实验来确定某一菌株的最佳降温速度,以保证菌种存活尽可能长的时间。

二、冷冻干燥保存

(一) 悬浮液制备

10%(*W*/*V*)脱脂奶粉、5%(*W*/*V*)肌醇,于 115℃ 灭菌 15 分钟。

(二) 孢子悬液制备

将菌种接于适宜培养基上生长至产生成熟的孢子,采用无菌操作加入上述悬浮液,用接种环或接种铲在菌落表面刮下孢子,制成孢子悬液。

(三) 冷冻干燥

操作方法同前。IMI 对冻干法保存丝状真菌的研究表明,11000 株菌中有 10000 以上的菌种可以存活,有很多属的菌种能保存 14 年以上(表 7-6),但也有一些菌种不适合用此法保存(表 7-7)。

表 7-6　采用 IMI 冻干法保存 4 年的部分丝状真菌*

犁头霉(*Absidia*)		
支顶孢(*Acremonium*)	假囊酵母(*Eremothecium*)	瓶霉(*Phialophora*)
放射毛霉(*Actinomucor*)	镰孢(*Fusarium*)	茎点霉(*Phoma*)
链格孢(*Alternaria*)	麻孢壳(*Gelasinospora*)	拟茎点霉(*Phomopsis*)
节皮菌(*Arthroderma*)	地霉(*Geotrichum*)	须霉(*Phycomyces*)
曲霉(*Aspergillus*)	赤霉(*Gibertella*)	旋枝霉(*Pirella*)
短柄霉(*Aureobasidium*)	粘鞭霉(*Gliomastix*)	髓霉(*Pithomyces*)
丝衣霉(*Byssochlamys*)	病霉(*Glomerella*)	根霉(*Rhizopus*)
头孢(*Cephalosporium*)	腐质霉(*Humicola*)	糖酵母(*Saccharomyces*)
尾孢(*Cercospora*)	小囊菌(*Microascus*)	帚霉(*Scopulariopsis*)
毛壳霉(*Chaetomium*)	毛霉(*Mucor*)	掷孢酵母(*Sporobolomyces*)
卷霉(*Circinella*)	球腔菌(*Mycosphaerella*)	葡萄穗霉(*Stachybotrys*)
枝孢(*Cladosporium*)	漆斑菌(*Myrothecium*)	葡柄霉(*Stemphylium*)
盾壳霉(*Cominotyrium*)	赤壳菌(*Nectria*)	共头霉(*Syncephalastrum*)
克银汉霉(*Cunninghamella*)	树粉孢(*Oidiodendron*)	草根霉(*Thielavia*)
弯孢(*Curvularia*)	蛇孢腔菌(*Ophiobolus*)	木霉(*Trichoderma*)
束孢霉(*Doratomyces*)	拟青霉(*Paecilomyces*)	长毛盘菌(*Trichophaea*)
德勒氏菌(*Drechslera*)	青霉(*Penicillium*)	黑腐皮壳菌(*Valsa*)
黑星菌(*Venturia*)	周刺座霉(*Volutella*)	接霉(*Zygorhynchus*)

表 7-7　不能用冻干法保存的丝状真菌

绵霉(*Achlya*)	革裥菌(*Lenzites*)	腐霉(*Pythium*)
蜜环霉(*Armillaria*)	光盘菌(*Nummularia*)	水霉(*Saprolegnia*)
壶菌(*Chytridium*)	革耳菌(*Panus*)	弹球菌(*Sphaerobolus*)
革盖菌(*Coriolus*)	褐柱丝霉(*Phaeoisariopsis*)	韧革菌(*Stereum*)
虫霉(*Entomopthora*)	叶点霉(*Phyllosticta*)	联轭霉(*Syzygites*)
层孔菌(*Fomes*)	绒孢菌(*Physarum*)	绿核菌(*Ustilaginoidea*)
灵芝(*Ganoderma*)	疫霉(*Phytophthora*)	小包脚菇(*Volvariella*)
香菇(*Lentinus*)	毛孢子菌(*Piedraia*)	柄锈菌(*Puccinia*)

§7.3　酵母菌的低温保存

一般认为,酵母抗逆性较强,所以其保存可能也较容易。但事实并非如此,许多对其他类型微生物适用的方法并不适用于酵母,

原因可能是由于酵母细胞体积相对于细菌较大，而且没有类似一些真菌所具有的抗逆性较强的孢子。为获得好的保存效果，要优化培养条件，使用合适的保护剂，控制降温速度并注意选择最好的保存方法。

一、冷冻干燥法

总体而言，用冻干法保存酵母菌效果不佳。NCYC 用此法保存的酵母菌存活率很低，例如，糖酵母为 5%，假丝酵母为 13%，酒香酵母仅为 2%，德克氏酵母、布氏弹孢酵母、掷孢酵母、红冬孢等属酵母菌的存活率也相当低。

二、冷冻法

与冻干法相比，冷冻法是保存酵母菌的较为理想的方法。在具体操作过程中，可采取两步降温法：首先将温度降到 -30℃，在此条件下细胞脱水，然后降温到 -196℃保存。此方法的优点是可以不管降温速度的快慢与否。其它具体操作方法同前。

NCYC 用此法保存酵母菌的存活率高于 60%。表 7-8 列出了成功地用此方法保存的酵母菌。

表 7-8　NCYC 用冷冻法(二步降温法)成功保存的酵母(属)

酒香酵母(*Brettanomyces*)	油脂酵母(*Lipomyces*)	类糖酵母(*Saccharomycodes*)
布氏弹孢酵母(*Bullera*)	梅奇酵母(*Metschnikowia*)	裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces*)
假丝酵母(*Candida*)	针孢酵母(*Nematospora*)	掷孢酵母(*Sporobolomyces*)
固囊酵母(*Citeromyces*)	管囊酵母(*Pachysolen*)	有孢圆酵母(*Torulaspora*)
隐球酵母(*Cryptococcus*)	毕赤氏酵母(*Pichia*)	三角酵母(*Trigonopsis*)
汉逊氏酵母(*Hansenula*)	红冬孢(*Rhodosporidium*)	温氏酵母(*Wingea*)
克勒氏酵母(*Kloeckera*)	红酵母(*Rhodotorula*)	接合糖酵母(*Zygosaccharomyces*)
克鲁维氏酵母(*Kluyveromyces*)	糖酵母(*Saccharomyces*)	

§7.4　藻类及原生动物的低温保存

一、藻类的低温保存

大部分藻类可用图 7-1 所示二步降温液氮法保存。值得注

意的是，有些藻类（如 *Cylindrocysitis brebissonii*）用冷冻法保存时降温速度要严格控制。

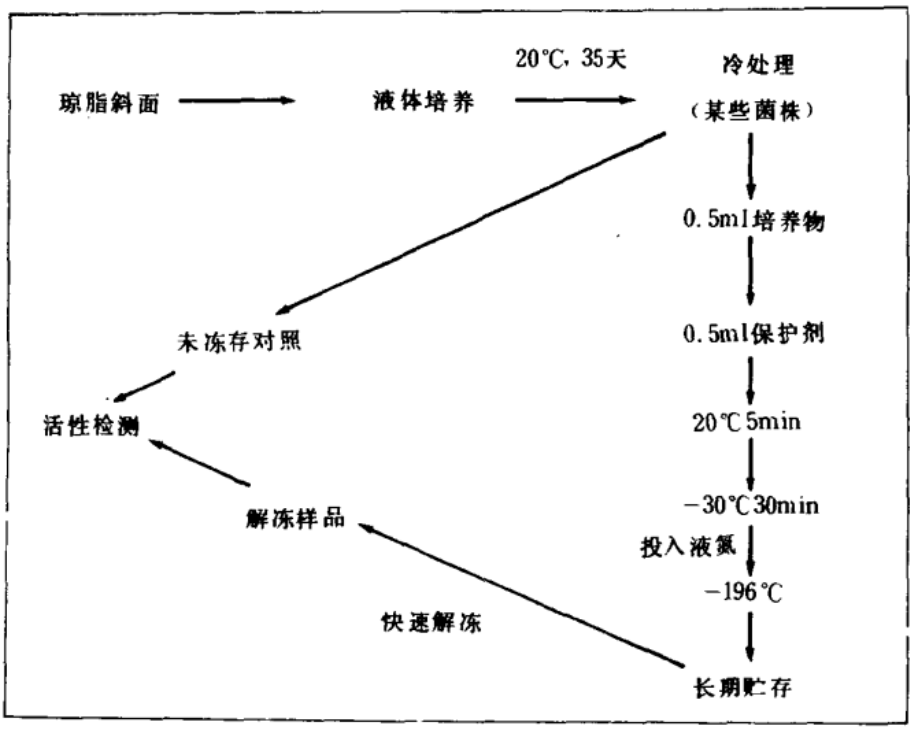


图 7-1　藻类二步降温液氮保存法示意图

二、原生动物低温保存

对于寄生型原生动物而言，常规的实验室宿主保存法常由于培养物的污染或宿主死亡而导致保藏物丢失，冷冻法保存克服了这些缺点。非寄生型原生动物也适于用冷冻法保存。

（一）慢速冷冻法

将样品以低于 1℃/min 的速度冷冻至 -60℃（某些菌种的冷冻速度高于每分钟 1℃），置于 -70℃ 左右低温冰箱保存过夜，然后置液氮保存。

（二）快速冷冻法

直接将装有样品的安瓿置于液氮保存。

（三）梯度冷冻法

样品首先在 -25 -35℃ 冷冻处理一段时间（几分钟至几十分

钟),然后移至预定的温度保存。

表 7-9　　原生动物的冷冻保存

种　　名	保护剂#(W/V)	方　　法
Aegyptianella pullorum	10% 甘油	*快速冷冻,液氮保存
Anaplasma marginale	2mol/L DMSO	*慢速冷冻,液氮保存
Babesia bigemina	14.2% DMSO	*慢速冷冻,液氮保存
B. bovis	10% PVP	*慢速冷冻,液氮保存
B. rodhaini	10.7% DMSO	*慢速冷冻,液氮保存
Cryptosporidium	5% ~10% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
Dieptosporidium	2.75% DMSO	*慢速冷冻,液氮保存
Eimeria(*sporozoites*)	7.5% 甘油	慢速冷冻,液氮保存
Eimeria(*sporocysts*)	7.5% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
Entamoeba histolytica	7.5% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
Giardia intestinalis	7.5% ~10.0% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
G. lamblia	6.5% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
Leishmania tropica	10.65% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
L. spp	7.5% 甘油	慢速冷冻,液氮保存
Naegleria	5.0% DMSO	慢速冷冻,液氮保存
Plasmodium Chabaudi	10% 甘油	快速冷冻,液氮保存
P. falciparum	10% 甘油	快速冷冻,液氮保存
P. galinaceum	10% 甘油	慢速冷冻,液氮保存
P. berghei	10% HES,50% 血清	*慢速冷冻,液氮保存
Theileria parva	7.5% 甘油	慢速冷冻,液氮保存
Toxoplasma gondii	5% 甘油	慢速冷冻至 -79℃ 保存
Trichomonas vaginalis	7.5% DMSO	梯度冷冻,液氮保存
Trypanosoma brulei	7.5% 甘油	慢、快冷冻,液氮保存
T. b. congolense	12% 甘油	慢、快冷冻,液氮保存
T. cruzi	10% DMSO	*慢速冷冻,液氮保存
	或 7% 甘油	*慢速冷冻,液氮保存

*慢速冷冻速度高于 1℃/min。

DMSO,二甲基亚砜;HES,羟乙基淀粉;PVP,聚乙烯吡咯烷酮。

§7.5 医学微生物菌种的低温保存

从微生物的发现到微生物学学科的建立、发展都与医学微生物息息相关。可以说,早期的微生物学研究对象主要是医学微生物。正是早期的医学微生物与人类疾病相关的研究,才奠定了微生物学发展成为同动物学、植物学相提并论的三大生物主干学科之一的基础。尽管微生物学现在已发展成为涉及工业、农业、环境和食品等领域的多种分支学科,但医学微生物学在微生物学中仍具有举足轻重的作用,它的研究关系人类的健康,一直受到微生物学家的密切关注。对于各类医学微生物的深入研究,仍是现代微生物学研究领域的热门课题。而微生物菌种作为医学微生物学研究的实验材料,占有非常重要的地位。安全可靠地保存微生物菌种,是保证各种研究能日复一日继续下去的关键。

就保存原理和方法而论,医学微生物菌种与普通微生物菌种的保存无根本区别。但由于医学微生物菌种一般具有致病性,所以在保存方法的选择和操作时要考虑接触传染及环境污染的问题,尤其是高度传染性的病原微生物菌种保存,要采取严格的防范措施。为方便读者查阅,现将医学微生物中常见的各大类群菌种的保存程序分别介绍如下。

一、医学细菌的保存

现已证明,大多数医学细菌能冷冻干燥保存;几乎所有的医学细菌可冷冻并保存在液氮中。无论是冷冻还是冻干保存,制备保存培养物操作程序是相似的。

(一) 菌液的制备

根据保存菌种的特性,选择最适的培养基和培养条件,使其培养至对数生长的晚期或稳定期的早期。用常法收集菌体,调整浓度到 $10^8 \sim 10^9$/ml。

(二) 加保护剂

(1) 冷冻保存方法(液氮) 冷冻保存法采用10%的甘油或二

甲亚砜作为保护剂。一般于菌悬液中直接加入10%的甘油或二甲亚砜，充分混匀即可。

(2) 冷冻干燥保存法(冻干)　冻干法可选择多种保护剂，视菌种的特性而定，常用的冻干保护剂有：20%的脱脂牛奶；12%的蔗糖；7.5%的葡萄糖马血清溶液；5%的蔗糖+25%马血清。用保护剂悬浮菌体，充分混匀，形成均匀的单个菌体。

(三) 分装安瓿(冷冻管)

(1) 分装0.5ml含10%甘油或二甲亚砜的悬液到1.8ml塑料冷冻管中(Costar Co. USA)，拧紧螺旋帽，标记菌名、批号、冻存日期，置4℃存放30分钟。

(2) 分装0.2ml待冻干菌液到安瓿管中，置4℃放置30分钟。

(四) 预冻

(1) 将冷冻管置程控降温仪冷冻室内，以-1.0℃/min的降温速率降至-30℃，然后以-10℃/min的速度降至-90℃以下。

(2) 将冻干安瓿置-30℃ 30分钟、-70℃ 2～3小时，让菌悬液充分冷冻。

(五) 冻干

将冻干安瓿于-70℃预冻2～3小时后，置冻干机冷冻真空干燥8～12小时，二次真空封口。

(六) 贮存

(1) 将冻存安瓿置液氮气相或液相长期保存。

(2) 将冻干安瓿贮4℃长期保存。

(七) 检测活性

采用常规方法检测两种保存条件的菌种活性。

(八) 污染源的处理

(1) 使用过的玻璃器皿、剩下的实验材料都必须高压灭菌，采用常法清洗。

(2) 操作台面及冻干机采用新洁尔灭液消毒，紫外灯照射30分钟以上。

(3) 操作者尽可能戴手套，离开实验室前要换衣服、洗手。

表 7－10 列出冷冻存和冻干保存一些常见病原细菌的结果，供参考。

表 7－10　　病原细菌冷冻和冻干保存结果

种　名	保护剂	冻干存活(年)	冷冻(－80℃)存活(年)
百日咳博德氏菌(*Bordetella pertussis*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	6	6
马尔他布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	6	6
白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	21	8
化脓棒杆菌(*C. pyogenes*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
牛肾盂炎棒杆菌(*C. renale*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	17	8
大肠杆菌(*Escherichia coli*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
杜氏嗜血菌(*Haemoyhilus ducreyi*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	15	\
流感嗜血菌(*Haemoyphilus influenzae*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	12	8
淋病奈氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	2	6
脑膜炎奈氏球菌(*N. meningitidis*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	2	6
微黄奈氏球菌(*N. subflava*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	6
普通变形菌(*Proteus vulgaris*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	10	8
绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	19	8
猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)	3% 脱脂乳＋5% 葡萄糖	19	8

续表

种　名	保护剂	冻干存活(年)	冷冻(-80℃)存活(年)
副伤寒沙门氏菌(*S. paratyphi*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	8
肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	8
薛氏沙门氏菌(*S. schottmuelleri*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	8
鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	19	12
痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	12	12
费氏志贺氏菌(*S. flexneri*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	19	12
宋氏志贺氏菌(*S. sonnei*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	12
金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	8
化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	16	12
血链球菌(*S. sanguis*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	10	12
霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖+10%抗坏血酸2ml	12	3
副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)	3%脱脂乳+5%葡萄糖	11	8

二、医学真菌和酵母的保存

临床医学的研究表明，由病原真菌和酵母菌引起的疾病在不断增加，过去认为是由细菌引起的疾病，现已证明与病原真菌有关；原来鉴定为非病原性的真菌，现已发现是不少疾病的病原菌。因此，严格地说，病原真菌和非病原真菌是难于区别的。它们是一群不可被忽视的致病菌，应该引起医学微生物学家的重视。作者认为，对医学真菌的保存与对于它们的分离、鉴定和致病性的研究工作同等重要，因为真菌的保存比其他微生物的保存要困难得多。即使是被认为保存细菌非常有效的冷冻干燥保存法，在保存很多

种真菌时结果却令人失望。所以，要选择合适的方法保存病原真菌，确保其形态学、生物学特性和致病性的稳定存在。另外，真菌和酵母的保存方法也有所差异，酵母能像细菌一样通过冷冻或冻干长期保存，无孢子真菌菌株则不宜用冻干保存，尤其是突变株和带质粒的菌株需用液氮直接冷冻保存，以避免特定遗传特征的改变或丧失。

（一）酵母的保存

（1）将酵母接种于固体培养基，于适宜温度（28℃）培养，以获得最佳的培养期细胞，制备菌悬液。

（2）菌悬液与20%的脱脂牛奶以1∶1的比例混合用于冻干。悬浮菌体加10%的甘油用于冷冻。

（3）充分混合，每个安瓿分装0.2ml菌液冻干；分装0.5ml菌液用于冷冻。

（4）按前述的方法采用冻干和液氮冷冻保存。

表7-11　　酵母菌冻干保存一览表

种　　名	保　护　剂	存活（年）
白假丝酵母（*Candida albicans*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	7
解脂假丝酵母（*C. lipolytica*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
热带假丝酵母（*C. tropicalis*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	5
产朊假丝酵母（*C. utilis*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
新型隐球酵母（*Cryptococcus neoformans*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	7
汉逊德巴利酵母（*Debaryomyces hansenii*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
扣囊拟内孢霉（*Endomycopsis fibuligera*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	7
异常汉逊酵母（*Hansenula anomala*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
施氏汉逊酵母（*H. schneggii*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
非洲克勒克酵母（*Kloeckera africana*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
油脂酵母（*Lipomyces*）	5%糊精+1%谷氨酸钠	5
膜醭毕赤氏酵母（*Pichia membra naefaciens*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
葡萄汁酵母（*S. uvarum*）	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6

续表

种　　名	保　护　剂	存活(年)
路德类酵母(*Saccharomycodes ludwigii*)	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
八孢裂殖酵母(*Schizosaccharomyces octosporus*)	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
无名球拟酵母(*Torulopsis famata*)	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	6
皮状丝孢酵母(*Trichosporon*)	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	5
威克酵母(*Wickerhamia fluorcscens*)	10%脱脂乳+1%谷氨酸钠	4

(二) 真菌的保存

用冻干的方法保存产孢子真菌的孢子,存活性好,保存期可达10年以上。

不产孢子的丝状真菌则不宜冻干保存,最佳的方法是采用液氮冷冻保存菌丝,操作程序如下:

(1) 常法固体培养丝状真菌,肉眼选择菌丝生长丰满、无杂菌污染的培养物冷冻。

(2) 用10%甘油洗下菌丝,加0.5ml菌丝悬液到冷冻管中,程控降温,冷冻于液氮中。

(3) 有的菌丝不易洗脱或挑起,用打孔法取出带固体琼脂的菌丝,接种于液体培养基,让菌丝生长2~3天,离心,用10%甘油悬浮菌丝体,分装冷冻。

值得注意的是,病原真菌,尤其是产孢子病原真菌保存的制备过程,一定要在高性能的生物安全台上进行,因为飞溅的孢子会污染环境和危害人体健康。

表7-12　　丝状真菌保存一览表

菌　　名	保护剂	冻干存活(年)
蓝色犁头霉(*Absidia coerulea*)	血清	19
柱孢犁头霉(*A. cylindrospora*)	血清	2~5
灰绿犁头霉(*A. glauca*)	血清	5

续表

菌　　名	保护剂	冻干存活(年)
透孢犁头霉(*A. hyalospora*)	血清	17
洋葱曲霉(*Aspergillus alliaceus*)	血清	15
阿姆期特丹曲霉(*A. amstelodami*)	血清	23
糙孢曲霉(*A. asperescens*)	血清	15
烟色泡盛曲霉(*A. awamori*)	血清	15
烟曲霉(*A. fumigatus*)	血清	23
螺卷毛壳(*Chaetomium cochliodes*)	血清	10
长刺毛壳(*C. dolichotrichum*)	血清	17
表皮癣菌(*Epidermophyton ieterdigitale*)	血清	23
微孢毛霉(*Mucor microsporus*)	血清	17
粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)	血清	9
棘孢青霉(*Penicillium aculeatum*)	血清	9
阿达青霉(*P. adametzi*)	血清	15
蓝青霉(*P. cyaneum*)	血清	15
意大利青霉(*P. italicum*)	血清	23
烩状青霉(*P. piceum*)	血清	15
疣状瓶霉(*Phialophora verrucosa*)	血清	7
酸根霉(*Rhizopus acidus*)	血清	6
台湾根霉(*R. formosaensis*)	血清	6
雅致枝霉(*Thamnidium elegans*)	血清	10
异配囊接霉(*Zygorhynchus*)	血清	23

三、医学病毒(噬菌体)、衣原体和立克次氏体的保存

病毒、衣原体和立克次氏体都是严格活细胞内寄生的微生物，它们的种属虽然没有细菌庞大，对它们的研究也不像细菌那么深入，尤其是保存研究的工作也还不够广泛，这里介绍的仅是目前常用的保存方法。

(一) 噬菌体的保存

噬菌体比动物病毒容易保存。几乎所有的噬菌体能用液氮保存，多数噬菌体能成功地冻干。CCTCC 作了几种噬菌体的冻干比

较，选用20%脱脂牛奶作保护剂，活性较好。

（1）制备噬菌体悬液　噬菌体感染宿主细菌，离心除去未裂解的菌体，用0.45μm和0.22μm的Millipore滤器过滤，贮存于2～8℃。

（2）测定滴度　采用双层软琼脂法测定噬菌体的效价，将浓度调至10^8个噬菌体/ml。

（3）冷冻　一般情况下，噬菌体可在无保护剂的条件下冷冻，加等体积20%的甘油或二甲亚砜可提高冻存的存活率。

（4）冻干　噬菌体悬液与20%脱脂牛奶等体积混合，每支安瓿分装0.2ml，常法冻干，效果良好。

表7-13　　常见病原菌噬菌体保存一览表

宿主菌名	噬菌体	保存方法	保存期（年）
产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）	8	液氮，冻干	5
产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）	92	液氮	6
梨火疫病欧文氏菌（*Erwinia amylovora*）	4 S	液氮，冻干	3
大肠杆菌（*Escherichia coli*）	M 13	液氮，冻干	5
单核球增多性利氏杆菌（*Listeria monocytogenes*）	243	液氮，冻干	7
假结核巴氏杆菌（*Pasteurella pseudotuberculosis*）	PS	液氮，冻干	5
铜绿色假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）	PP7	液氮，冻干	8
恶臭假单胞菌（*P. putida*）	gh 1	液氮，冻干	7
假单胞菌（*P. sp.*）	PM 2	液氮，冻干	7
乙种副伤寒沙门氏菌（*Salmonella schottmuelleri*）	31	液氮，冻干	5
鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）	P 22	液氮，冻干	4
志贺氏杆菌（*Shigella sp.*）	37	液氮，冻干	8
金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）	K	液氮，冻干	10
霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）	138	液氮，冻干	4
鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）	Y	液氮，冻干	9

注：（1）液氮保存时，用10%甘油或二甲亚砜作保护剂。

（2）冻干保存时，用10%的脱脂牛奶为保护剂。

（二）病毒的保存

至今为止，还无一种单一的保存程序能有效地保存所有的病

毒。病毒的繁殖条件和使用保护剂的种类、浓度都直接影响保存方法的选择，而每种方法的选择要建立在多次实验的基础之上。下面介绍的是ATCC使用的保存方法。CCTCC参照这些保存方法，能在不同条件下，有效地保存多种病毒。

(1) 直接冷冻　多数的胞外病毒(裂解宿主细胞的病毒)在收集感染宿主的裂解液后，直接快速冷冻保存效果甚佳。其操作是：分装0.5～1.0ml的病毒悬液于冷冻管中，置－30℃冰箱或干冰中预冻30分钟，贮存在－70℃或液氮中。

(2) 程控冷冻　像水痘——疱疹病毒，它感染宿主细胞后，不裂解宿主细胞，而是存在于细胞内。这类病毒的保存需添加保护剂直接保存宿主细胞，并用程控降温法冻存，以避免快速降温造成对宿主细胞的损伤。

① 选择经病毒感染的病变细胞，用胰酶消化或刮棒使细胞脱壁，离心收集细胞。

② 加入10%二甲亚砜液，充分悬浮细胞，分装1.0ml细胞悬液到冷冻管中，用常法冻于液氮中。

③ 有的研究者习惯将收集的病变细胞通过冻－融循环几次，使宿主病变细胞破裂，病毒释放到液体中，离心弃沉淀，取上清液加10%热灭活的胎牛血清(FBS)和7%的二甲亚砜，分装于冷冻管，用常法冻存于液氮中。

(3) 冻干　多种裂解病毒均可用冻干方法保存，在冻干保存时，保护剂的合理选择、冻干条件的优化对病毒的存活率、保存期限和生物学特性的保持尤为重要。

① 用常法制备病毒悬液。选用10%的葡萄糖、20%脱脂牛奶或20%灭活牛血清作为保护剂，悬浮病毒。

② 分装于安瓿，于－30℃预冻18～48小时，或－70℃预冻2～4小时。CCTCC采用－70℃预冻过夜的预冻程序。

③ 用常法冻干、封口，于4℃贮存。

④ 常温下用无菌水复水冻干病毒，充分混匀，用培养液或PBS液稀释，加适当稀释度的病毒感染宿主细胞，测定病毒滴度。

(4) 鸡胚增殖病毒直接冻干　感染鸡胚的病毒，经适当处理后用无菌操作收集，可直接冻干。鸡胚增殖病毒主要来自尿囊液和卵黄。这类病毒收集液含有丰富的蛋白质和营养成分，pH 值及渗透压也适合病毒的冻干，不加任何保护剂冻干效果良好。

(三) 衣原体的保存

衣原体通常采用液氮冷冻长期保存。最近 ATCC 采用加等体积的 10% 胎牛血清和 20% 蔗糖溶液到衣原体悬液中，成功地冻干保存肺炎衣原体。

(四) 立克次氏体的保存

过去立克次氏体的保存一般是冷冻保存感染脏器、鸡胚、卵黄囊材料和组织培养物。后来经过研究发现，立克次氏体也可冻干保存，尽管在处理过程中活性会降低到起始活性的 1/10～1/100，但保存过程中几乎不再降低。因此，现在采用高感染滴度的材料冻干，以 10% 脱脂牛奶作保护剂，冷干后长期保存。

表 7－14　动物病毒、立克次氏体和衣原体的冷冻保存

种　　名	材料制备	保　护　剂
腺病毒(*Adenovirus*)	感染上清液	/
布尼病毒(*Bunyavirus*)	20% 病变鼠脑浸液	/
嵌杯状病毒(*Calicivirus*)	感染悬液	MEM 培养液＋2% 胎牛血清
冠状病毒(*Coronavirus*)	病变的原代细胞	MEM 培养液＋15% 胎牛血清＋1% 谷氨酰胺
黄病毒(*Flavivirus*)	感染悬液	血清(1:1)
疱疹病毒(*Herpesvirus*)	感染上清液	MEM 培养液＋5% 胎牛血清＋0.1mol 蔗糖
正粘病毒(*Orthomyxovirus*)	感染尿囊液	10% 蔗糖
乳多空病毒(*Papovavirus*)	病毒悬液	0.1% 的牛血清白蛋白
鹦鹉副粘病毒(*Paramyxovirus*)	感染悬液	1% 的牛血清白蛋白
细小病毒(*Parvovirus*)	感染细胞	BEM 培养液＋2% 胎牛血清
小 RNA 病毒(*Picornavirus*)	感染上清液	MEM 培养液＋2% 胎牛血清

续表

种　　名	材料制备	保　护　剂
痘病毒(*Poxvirus*)	感染上清液	MEM培养液+5%胎牛血清
呼肠病毒(*Reovirus*)	感染上清液	/
反录病毒(*Retrovirus*)	感染上清液	/
弹状病毒(*Rhabdovirus*)	10%病变鼠脑浸液	10%马血清
轮状病毒(*Rotavirus*)	感染上清液	10%胎牛血清
衣原体(*Chlamydia*)	20%病变卵黄囊	牛心浸汁
恙虫热立克(*Rickettsia tsutsugamushi*)	感染小鼠肝组织浸液	10%牛血清次氏体
潜热立克次氏体(*R. Sennetsu*)	感染小鼠肝组织浸液	10%牛血清次氏体
五日热立克次氏体(*R. quintana*)	培养悬液	0.2mol蔗糖液

表7-15　动物病毒、立克次氏体和衣原体的冻干保存

种　　名	材料制备	保　护　剂
腺病毒(*Adenovirus*)	感染上清液	10%蛋白胨水
冠状病毒(*Coronavirus*)	感染悬液	MEM培养液+15%胎牛血清
黄病毒(*Flavivirus*)	病变原代细胞	/
疱疹病毒(*Herpesvirus*)	感染皮肤浸液	0.2mol蔗糖液
环状病毒(*Orbivirus*)	感染上清液	10%乳糖水
正粘病毒(*Orthomyxovirus*)	感染尿囊液	10%马血清
乳多空病毒(*Papovavirus*)	病毒悬液	0.1%牛血清白蛋白
副粘病毒(*Paramyxovirus*)	感染尿囊液	/
细小病毒(*Parvovirus*)	感染上清液	15%脱脂牛奶
小RNA病毒(*Picornavirus*)	感染上清液	/
痘病毒(*Poxvirus*)	感液上清液	20%脱脂牛奶
呼肠病毒(*Reovirus*)	感染上清液	/
反录病毒(*Retrovirus*)	感染上清液	/
轮状病毒(*Rotavirus*)	感染液	2%灭活血清+20%脱脂牛奶
披膜病毒(*Togavirus*)		

续表

种　　名	材料制备	保　护　剂
衣原体(*Chlamydia*)	20%卵黄囊	牛心浸汁
莫氏立克次氏体(*Rickettsia mooseri*)	病变卵黄囊	0.2mol 蔗糖水
普氏立克次氏体(*R. prowazeki*)	病变卵黄囊	0.2mol 蔗糖水
立克立克次氏体(*R. rickcttsii*)	病变卵黄囊	0.2mol 蔗糖水
恙虫热立克次氏体(*R. tsutsugamushi*)	病变卵黄囊	0.2mol 蔗糖水
勃氏科克氏体(*Coxiella burnetii*)	病变卵黄囊	0.2mol 蔗糖水

四、医学原生动物和藻类保存

ATCC 采用上百种程序保存 1000 多株原生动物和藻类。所有的原生动物和藻类均可稳定地贮存液氮中，那些在生活史中能形成抗性期的株系可干燥保存，具有细胞壁的藻株已证明用冻干保存效果较好，但是它们的保存材料制备和保护剂的种类、浓度差异极大。有的甚至同一属而不同种，其制备程序和保护剂浓度也不一样，这就给保存新的种属带来困难。表 7－16 列出了 ATCC 保存现有属的原生动物和藻类的保存方法和保护剂浓度，可以供参考。

表 7－16　　ATCC 原生动物和藻类的冻存

属　　名	保　护　剂	保存法
星棘变形虫(*Acanthamoeba*)	5%～7.5%二甲亚砜	液氮
巴贝虫(*Babesia*)	16.7%甘油	液氮
棘虫(*Blepharisma*)	7.5%二甲亚砜	液氮
波豆虫(*Bodo*)	10%二甲亚砜	液氮
葡萄虫(*Botrydium*)	7%二甲亚砜或 10%甘油	液氮
斜管虫(*Chilodonella*)	7.5%二甲亚砜	液氮
衣滴虫(*Chlamydomonas*)	5%～7.5%二甲亚砜或 7.5%甲醇	液氮
足衣虫(*Chlamydophrys*)	5%二甲亚砜	液氮
绿梭藻虫(*Chlorogonium*)	5%二甲亚砜	液氮
肾形虫(*Colpoda*)	7.5%二甲亚砜	液氮

续表

属　　名	保　护　剂	保存法
短膜虫(*Crithidia*)	5%二甲亚砜	液氮
柿毛虫(*Didinium*)	10%二甲亚砜	液氮
双核变形虫(*Dientamoeba*)	9%二甲亚砜+3.5%蔗糖+20%灭活血清	液氮
长颈虫(*Dileptus*)	7.5%二甲亚砜	液氮
艾美球虫(*Eimeria*)	7.5%二甲亚砜	液氮
贾第虫(*Giardia*)	12%二甲亚砜+4% 蔗糖	液氮
瞬目虫(*Glaucoma*)	10%二甲亚砜	液氮
六鞭毛虫(*Hexamita*)	10%二甲亚砜	液氮
细滴虫(*Leptomonas*)	5%二甲亚砜	液氮
微粒子虫(*Nosema*)	5%甘油	液氮
赭球虫(*Ochromonas*)	10%二甲亚砜或7.5%甲醇	液氮
屋滴虫(*Oikomonas*)	10%二甲亚砜	液氮
草履虫(*Paramecium*)	7.5%二甲亚砜或7.5%二甲亚砜+1.25%牛血清白蛋白	液氮
拟变形虫(*Paramoeba*)	5%二甲亚砜	液氮
疟虫(*Plasmodium*)	10%甘油(体内株),28%甘油+3%山梨醇+65% NaCl(体外株)	液氮
素衣藻虫(*Polytoma*)	5%甲醇	液氮
短柱虫(*Rhabdostyla*)	7.5%二甲亚砜	液氮
吻滴虫(*Rhynchomonas*)	5%二甲亚砜	液氮
锥滴虫(*Trepomonas*)	10% 二甲亚砜	液氮
毛滴虫(*Trichomonas*)	5% 二甲亚砜	液氮
简变虫(*Vahlkampfia*)	5%～7.5% 二甲亚砜	液氮
钟　虫(*Vorticella*)	7.5% 二甲亚砜	液氮
鱼腥藻(*Anabaena*)	10% 甘油	液氮
衣　藻(*Chlamydomonas*)	10% 甘油	液氮
小球藻(*Chlorella*)	10% 甘油	液氮

第 3 篇　动物材料的低温生物学

第 8 章　细胞培养物的低温冻存

§8.1　细胞培养物冻存及其质量控制概述

一、意义

细胞培养物(cell culture)指在离体条件下具有继代生长、增殖能力的细胞材料,通常包括动物细胞系(株)、人体细胞系(株)、杂交瘤、转基因细胞、特殊产品表达细胞、昆虫细胞等。细胞冻存(freezing cells)则是应用 -70℃以下的超低温条件,保存细胞培养物,使其达到长期贮存的目的。而所谓细胞培养物质量控制就是采用多种特殊的检测技术,对研究、保藏、使用中的细胞培养物进行检测,发现可能存在的污染源,排除其潜在的危险性,保持细胞培养物的高品质状态。细胞培养物的冻存及质量控制具有重要意义,概括起来至少可以分以下三个方面。

(一) 有利于动物细胞产品的开发和利用

动物细胞的体外培养物,能产生许多有价值的生物制品,包括重要的疫苗、高效的治疗药物和灵敏的检测、诊断试剂。目前,我国应用分子生物学技术、免疫学方法和遗传工程手段,通过动物细胞培养生产乙肝疫苗、单克隆抗体、尿激酶、乙脑疫苗、狂犬疫苗、

红细胞生成素和血小板生成素等生物制品已成为可能。但动物细胞在研制和生产过程中的培养、保藏、质量控制一直存在问题。据报道，由于前期细胞培养物质量欠佳(污染微生物、支原体等)，影响生物制品产量和质量，造成难以估量的重大经济损失。此外，随着生物工程的进展，使得很多只能由动物体内产生的蛋白质，可由重组的微生物产生，如重组的大肠杆菌表达和生产人胰岛素和人生长激素。但由于微生物细胞缺少蛋白质的转录后修饰机制，重组微生物产生的很多蛋白质分子不具有所期望的生物学功能和活力，实际应用存在很大的差距。而动物细胞却具备微生物所缺少的蛋白质转录后的修饰功能，而且动物细胞的产物往往分泌到细胞外，有利于分离、纯化。为此，利用转基因动物细胞生产有价值生化产品、治疗药物的技术越来越被人们重视。综上所述，无论生物制品还是生化产品，其制备过程均涉及细胞培养物交换、使用、保存问题。可见，细胞培养物培养、冻存、质量控制的重要性在于它直接影响生物技术产品的开发和利用。

(二) 有利于生命科学和基础医学研究水平的提高

在长期的研究工作中，除了部分研究者意识到细胞培养物质量控制的重要性，注意选择、控制细胞培养的质量及来源外，多数研究者由于无统一质量控制的检测标准，往往忽视了控制细胞培养物的质量，至使很多研究论文水平不高，实验结果重复性差，同时还浪费了大量的人力、物力和财力。生命科学和医学是实验性很强的学科，结果的稳定性和重复性虽受很多因素的影响，但以细胞为实验材料研究生命现象，细胞培养物的质量优劣直接影响结果的可靠性和重复性。所以，近几年生命科学和医学界的很多前辈、中青年专家，尤其是国外学成归国的青年科学家，都在呼吁采取措施尽快建立我国的细胞培养物冻存及质量控制与检测标准化系统，将用于科学研究的细胞培养物的质量控制纳入正轨，为提高我国科学研究水平奠定基础。同时，对研究论文发表的质量提出更高的标准，要求对细胞培养物质量控制检测结果予以重视，尽快与国际接轨、增强科学学术论文在国外的竞争力。

（三）有利于国际间细胞培养物的引种和交换

许多生物学家认为，一个国家或地区，培养物种类和数量的拥有量、质量的优劣及对培养物研究、开发、利用的状况将对科学发展和经济产生重大的影响。培养物作为生命科学和医学科学研究和应用的材料，若缺乏则会使研究工作被迫改变、中止、甚至取消。因此，世界各国和地区都在努力扩大自己培养物的保藏数量和种类。鉴于细胞培养物作为一类特殊的培养物在保藏上的重要性，日本大阪发酵所（IFO）、德国培养物保藏所（DSM），都在近年内扩大保藏范围，将细胞培养物列入保藏对象。据资料统计，到目前为止，国内外编入细胞目录的动物细胞系（株）仅包括 105 个种的 5000 余株，其中国内编目的不到 1000 株，不足总数的 1/5，况且还有相当一部分的细胞品质极低。这与我国的科学研究水平，经济发展趋势是极不适应的。今后的一个相当时期内，始终面临细胞培养物引种、交换、与国际接轨的问题，这就给我国细胞培养物的培养、保藏、使用、管理提出更高的要求。

二、基本程序与要求

实验室内培养的动物细胞系（株）、杂交瘤、肿瘤细胞等细胞培养物，需要定时传代，这是一项繁重的工作；而且由于细胞连续传代，增加了细胞交叉污染、微生物污染和遗传变异的危险性。二倍体细胞的连续传代则会过早地衰老死亡。因此，细胞保存是细胞学、免疫学、临床低温医学及相关学科研究应用中的一个十分重要的基础工作。从 60 年代初起，发达国家都先后建立专门机构——细胞库（cell bank）保存各类细胞系（株）。设在武汉大学的中国典型培养物保藏中心（China Center for Type Culture Collection，简称 CCTCC），建立于 1985 年 3 月，主要承担国内外专利和非专利培养物（包括各类微生物菌种，动、植物细胞系、病毒、体外质粒、单细胞藻类）保藏。目前，保藏中心已收集、保存国内外的专利和非专利培养物 4000 余株。细胞保藏库作为保藏中心的一部分，至今已收集、保存了来自美国、日本、德国、澳大利亚、加拿大、荷兰、瑞士和国内专利申请人提交的专利动物细胞系（株）、杂交瘤、遗传基因

转化细胞、肿瘤细胞和非专利细胞培养物300多株。各种细胞培养物均采用液氮超低温冻存。参照美国典型培养物保藏所

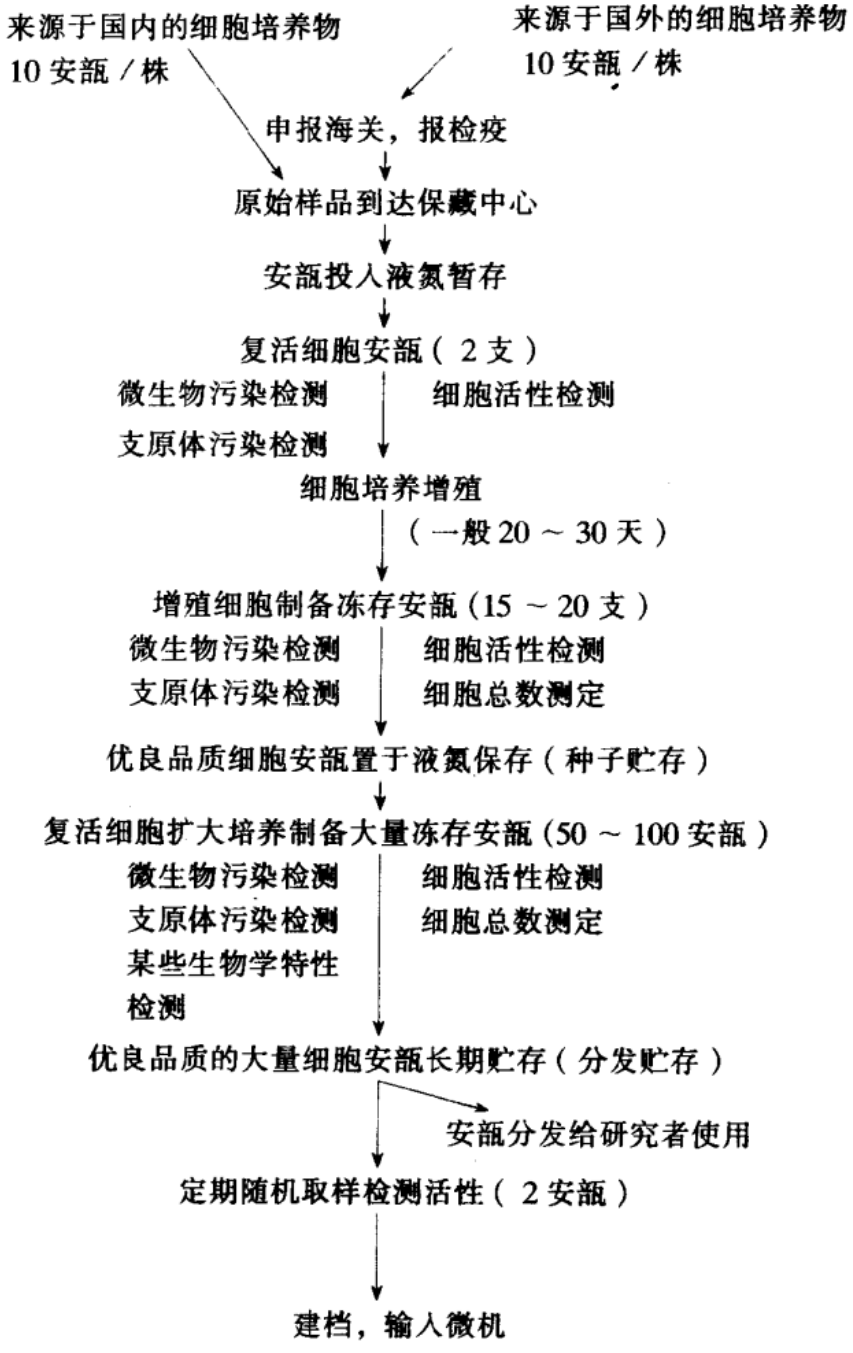


图8－1　保藏中心细胞培养物保藏标准程序

(American Type Culture Collection, ATCC, USA)、欧洲动物细胞保藏中心(European Collection of Animal Cell Culture, ECACC, UK)、日本 RIKEN 细胞库(RIKEN Cell Bank, Japan)的标准方法，对保存的细胞培养物进行严格质量控制和管理。其程序如图 8-1 所示。

保藏中心细胞培养物保存的标准程序是在参考国外资料的基础上，经过十几年的实践，不断改进、不断完善制定的，程序强调了细胞保存中质量控制的重要性。按照以上程序控制细胞培养物的入库质量、细胞的入库率、复活率和存活性均可获得令人满意的结果。作者认为，其冷冻保存程序中，一种好的冷冻方法的选择，某些保存条件的优化对于提高细胞存活率、确保细胞的长期、稳定保存是至关重要的。不言而喻，一个保存多种动物细胞和杂交瘤的实验室，如研究者不尽快建立成熟的长期保存方法，那么这些细胞就可能因保存不当而变异或死亡。所幸的是，一般研究人员都很注意选择适宜的方法保存自己的细胞培养物，有的还购置先进的保存仪器设备，在条件上做到尽善尽美。然而，优良品质的细胞培养物保存仅仅在保存设备条件上花功夫是不够的，更重要的是要在细胞的质量控制上有更多的投入，建立、实施一整套严格的细胞保存质量控制方法和技术。而这一点往往被一般研究人员所疏忽。严格地说，优良的细胞保存设备、完善的保存手段，是低温保存活细胞的基础，而全面的质量控制则主导了保存细胞材料的品质。无严格的质量控制手段作保证，保存再多的细胞也是徒劳的，无任何使用价值。试想，长期保存那些虽然活性很高但污染了支原体或存在交叉污染的细胞有何用处。任何一个精良的细胞保存库或普通细胞保存实验室都必须强调质量控制的重要性。国内现有的很多有关细胞培养物保存的出版物中，对质量控制问题很少强调或强调不够，尤其是质量控制的技术、方法介绍甚少。鉴于此，这一章中，在介绍保存原理、方法的同时，综合介绍国外和作者实验室目前应用的一些主要的细胞质量控制方法、技术，并尽可能对技术的特点、应用效果作出评估。

§8.2 细胞培养物冷冻保存的原理和方法

早在40年代，人们就已经证明了人类精子对－79℃乃至－196℃的超低温具有一定的抵抗力。随后又发现，一定浓度范围的甘油对低温保存动物细胞具有良好的保护作用，于细胞悬浮液中加入甘油，可以明显地提高其在－70℃的存活率。60年代，另一种化学试剂——二甲亚砜(DMSO)又被用作细胞的低温保护剂，使细胞低温保存中使用的保护剂更广泛。应用甘油或二甲亚砜作保护剂，已经可以成功地低温保存各种动物细胞，特别是使用－196℃的液氮超低温保存技术以来，长期保存不同来源的细胞培养物已不成问题。其基本原理在于将培养至对数生长晚期的细胞收集，用适宜浓度的低温保护剂悬浮，分装冻存安瓿，并以最佳降温速率降到－100℃以下，投入液氮冻存。在如此条件下，细胞处于极低的代谢状态，停止生长，因此，可以达到长期保存的目的。一般而言，细胞保存时间的长短与温度密切相关：温度越低，保存时间越长。有人认为，液氮深层(－196℃)冻存的细胞至少可以存活上百年。所以国内外几乎所有的细胞实验室、细胞库均采用液氮保存细胞培养物。这种方法自50年代保存继代细胞系至今，已50余年的历史。50多年来，低温生物学家、培养物保存专家的研究成果，主要集中在低温保护剂的选择、冷冻速率的改进及低温保存机理的探讨等方面，在保存手段上并没有新的突破。直到现在，采用液氮保存细胞培养物，仍然被公认为最佳的方法，它被广泛地应用于生物学、基础医学、临床医学及有关科学。

鉴于细胞保存的低温保护剂选择，冷冻速率的确定、保存机理的内容已在有关章节中论述，这一节中就不重复讨论了，仅重点介绍细胞培养物的液氮保存方法，简要讨论细胞－70℃深冻的利弊。

一、细胞培养物的液氮保存法

如前所述，细胞培养物采用液氮保存是目前最佳的方法，它适合于各种细胞的长期保存。作者于1985年以来保存于液氮中的

动物细胞、人体二倍体细胞、昆虫细胞、肿瘤基因转化细胞、营养缺陷型细胞和杂交瘤细胞共300余株，几经复核，存活率下降无几，细胞学特性相当稳定。以下将详细介绍我们用于冻存、复苏和管理这些细胞培养物的常规方法。这种程序既适合于大批量低温保存细胞培养物的细胞库，也有用于建立较小规模的细胞低温保存实验室。

（一）安瓿或冷冻管的准备

（1）将洁净安瓿用记号笔注明冻存细胞名称、冻存批号、冻存日期，于120℃左右烘烤1～2小时，使墨迹烘干。

（2）分别于烘干安瓿颈上加盖一个玻璃帽，排列于不锈钢安瓿架上，用牛皮纸包扎结实，180℃干热灭菌2～3小时，备用。

（3）将塑料冷冻管预先辐射灭菌，标注冻存细胞名称、冻存批号和冻存日期即可。

（二）细胞冻存液的制备

（1）选择适当的低温保护剂（甘油、二甲亚砜），记录其来源、批号和除菌日期。

（2）使用前，取待冻细胞的培养液，加入10%（V/V）的二甲亚砜或甘油，充分混匀，制成细胞冻存液，暂存于4℃。一般以待冻存细胞的培养液加保护剂作为冻存液，有的细胞选用90%的小牛血清加10%的保护剂效果更好。

（三）冻存细胞的制备与分装

（1）细胞收集　选择生长旺盛的培养物（对数生长期、形态正常、无污染的细胞培养物），更换新鲜培养液，继续培养24小时。用常规方法收集细胞，显微细胞计数，调整细胞浓度为10^6～10^7个/ml。

（2）悬浮细胞　计数后的细胞悬液于1000r/min离心10分钟，将沉集细胞用等体积的冻存液重新悬浮。如细胞悬浮液pH过高，可直接通入5%的无菌CO_2气体调节pH值。

（3）分装　用1ml无菌吸管吸取细胞悬液1ml注入安瓿中，操作要迅速并不断混匀，安瓿标签标明的细胞名称必须同所分装的细胞一致。使用塑料冻存管贮存细胞时，在分装细胞后，拧紧螺

旋帽，待冷冻。

（4）取样检测和计数　分装结束前，分别取样作微生物污染检测（方法见后）。留 0.5ml 左右的细胞悬液显微计数，计算冻存细胞的细胞总数、存活率（%）。

（四）安瓿封口和检漏

（1）用煤气－氧气喷灯封口。将安瓿的颈端置火焰的高温区，旋转加热拉长封口，以减少安瓿顶端留下微孔。封口必须十分可靠，否则从液氮中取出时会发生爆炸，造成事故。

（2）将封口后的安瓿固定在铝制安瓿夹上，置于盛有 0.05% 美蓝液的容器中，让美蓝液充分浸泡安瓿，于 4℃冷库放置 30 分钟。

（3）取出安瓿夹，用自来水冲洗，弃去渗入了美蓝染料的安瓿，其余的擦干，待冷冻。

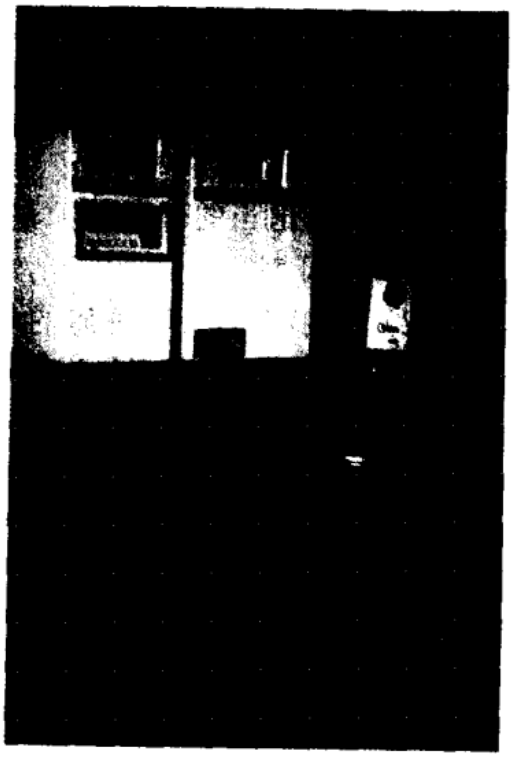


图 8－2　KRYO—10 程控降温仪
（Planer products ltd. England）

（五）安瓿冻存和记录

（1）打开程控降温仪（图 8－2），根据冻存细胞的类型、细胞浓度、保护剂种类设定降温速率。一般固定程序为：以 －1.0℃/min 速率降至 －30℃，再以 －5.0℃/min 速率降至 －120℃以下。

（2）检查自动记录仪工作状况，设定降温程序编号、冻存细胞名称、日期。

（3）将冻存安瓿插入程控降温仪冷冻室支架上，调出预先设定的标准程序，进行程控降温。

（4）安瓿冻至 －120℃时，降温仪自动报警，迅速取出安瓿夹，投入 MVE800 液氮容器（图 8－3）中贮存。

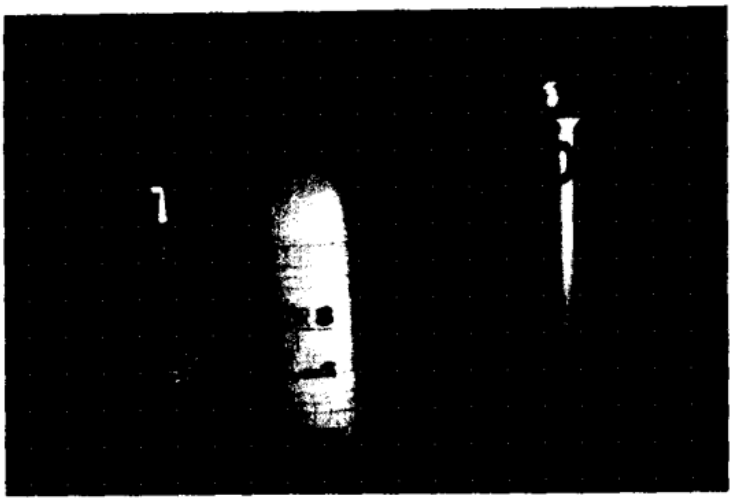


图 8－3　MVE－XLC800 液氮容器(Minnesota valley engineering Inc. USA)

(5) 记录细胞贮存位置,取下自动记录的降温曲线纸件,建卡,建档。

(六) 冻存细胞的复核及检测

(1) 复苏细胞的操作时必须戴面罩、绝热手套,以保护面部和颈部,防止手冻伤。

(2) 核对细胞名称、批号、贮存位置。从液氮中取出 3 个安瓿,立即投入 37～40℃水浴中,摇动安瓿使冷冻细胞融化。融化尽可能在 1 分钟内完成。

(3) 将安瓿移至生物安全操作台台面上,用 70%酒精溶液消毒表面,启封。

(4) 用 1ml 无菌吸管吸取 1 支安瓿内的细胞悬液,接种到 2 个 T－25 或 1 个 T－75 塑料细胞培养瓶(Costar Co. USA)中,T－25 加 7ml 或 T－75 加 12ml 新鲜的培养液,通入适量 5%的无菌 CO_2,用常法密闭培养 2～3 天。

(5) 将其余 2 支安瓿的细胞悬液移至 1 支无菌小离心管中,充分混匀。

(6) 分别接种 0.3ml 混合细胞悬液至 SDB 管、BHI 管、THIO

管、TSB管中和血液平板上(培养基的制备见“微生物污染检测”),常法培养2～3周,作微生物污染检测试验。

(7) 取0.1ml混合细胞悬液与0.1ml 0.5%的胎盼蓝液混合,用微量进样器取样加入血球计数板计数室内,置光学显微镜低倍物镜下计细胞总数、细胞存活率(%)。

(8) 取0.4ml混合细胞悬液作支原体污染检测(方法见后)。

(七) 结果观察和整理资料

(1) 观察T－25或T－75瓶细胞生长情况,核实微生物污染检测试验的各管及血液平板,作支原体荧光染色观察照相。记录结果,进行冻存细胞的品质评估。

(2) 整理冻存细胞资料,必要时建档,输入微机数据库。

二、细胞培养物的－70℃深冻保存法

细胞培养物的－70℃深冻保存采用机械冰箱,适用于无液氮源的实验室。它具有安瓿取存方便的优点,特别适宜短期保存细胞(半年内)。其制备安瓿的操作程序与液氮保存法完全相同。

长期保存细胞不宜用－70℃冰箱保存。在－70℃条件下,细胞自然死亡率明显加快。据报道,动物细胞于液氮中保存1～2年,存活率一般可达90%以上;而在－70℃冰箱内保存同样时间的细胞,存活率不到10%,有时仅2%～3%。这将给细胞的复苏、培养带来困难。尤其是淋巴细胞、杂交瘤细胞更不宜采用－70℃冰箱保存。加之停电、机械故障等因素,冰箱的温度波动变化无法控制,造成贮存细胞的过早“衰老”、死亡,所以－70℃冰箱只能作为液氮保存的一种过渡形式或临时措施。

§8.3 细胞培养物冻存的实用方法

动物细胞培养物的冻存是生命科学研究中一项最基础、最重要的工作之一。当一株新细胞系的建立,或一株具有某种特性的克隆细胞株的鉴定完毕,及时冻存“原种”(seed stock)是非常必要的。当引进一株新的细胞系时,也有冻存“原种”的必要。当然,研

究工作的间断或阶段性工作的结束，冻存所用细胞系（株）就更为普遍了。总之，无论是冻存细胞原种还是冻存研究用细胞系（株），其目的只有一个，即减少细胞的污染、遗传特性的丢失及保持生理特性的稳定。液氮冻存细胞是目前最为有效的方法，已被国内外众多的实验室、细胞库常规使用。尽管各实验室、细胞库之间使用的冻存技术是大同小异，但趋于财力、物力，实验室条件有限，在操作程序上还是有所不同。尤其是国内的普通实验室，甚至还存在某种弊端，使细胞冻存后的存活率极低。因此，作者将 CCTCC 动物细胞冻存的标准程序列出，供使用者参考。

一、细胞冻存所需材料和器具

（一）待冻存细胞系（株）

（1）悬浮培养细胞系（HL－60，K562，H9）。

（2）单层培养细胞系（KMB－17，Hela，BHK－21，Vero）。

（二）试剂

（1）生长培养液　DMFM、RPMI1640、F12－K 等商品培养基，按§8.4 介绍的方法制备，补加 10% 胎牛血清或 12%～15% 的小牛血清，不加任何抗生素。

（2）消化液（0.25% 胰酶）　将胰酶（GIBCO，0.25%）、EDTA－Na_2（0.03%）用无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 Hank's 液充分溶解，再用 2mol/L 的 NaOH 调 pH 到 7.5，过滤除菌，分装后贮存于－30℃备用。

（3）保护剂　10%～20%（V/V）的二甲亚砜（DMSO），使用前用生长培养液配制。

（4）消毒液　70%（V/V）的酒精，用双蒸水配制。

（三）器具

（1）塑料培养瓶（T－25、T－75、T－150，Costar，USA）或玻璃培养瓶。

（2）塑料冻存管（1.8ml/支，Costar，USA）。

（3）血球计数器或细胞计数器。

（4）－85℃冻箱，程控降温仪，CO_2 培养箱，液氮溶器，冻存管

夹子。

(5) 水浴锅,防护面罩,手套,离心机。

二、动物细胞的培养

动物细胞的接种、培养、传代均在严格的无菌条件下操作,否则会造成培养细胞污染或带毒细胞污染环境。采用 P2 级的生物安全台可以达到细胞传代的目的。

(一) 悬浮细胞的培养

(1) 接种　悬浮细胞一般采用 RPMI1640 培养液培养,细胞接种量为每毫升 $10^4 \sim 10^5$ 个。T-25 瓶加 8～10ml 培养液。T-75 瓶加 15～20ml 培养液。

(2) 培养　悬浮细胞通常采用 CO_2 培养箱培养,水饱和空气中含 5%CO_2,培养瓶的盖子必须拧松,保证瓶内外气体交换。但是,CO_2 培养箱培养细胞增加了污染的机会,所以作者采用直接向细胞培养瓶内通入 5%的无菌 CO_2 的改良方法,不仅达到增加瓶内 CO_2 浓度的目的,而且避免了培养期的污染。

(3) 传代　悬浮细胞传代可以按 1:2、1:3、1:4 的不同细胞浓度传代,视细胞生长快慢而定。

(4) 调整细胞的生理状态　最佳生理状态对于细胞冻存效果影响明显,所以,在细胞冻存前的一天,应补加适量的新鲜培养液(15%～20%的血清),继续培养 18～24 小时,使细胞的生长达到最佳状态(对数生长晚期)。

(二) 单层细胞的培养

(1) 接种　单层细胞采用 MEM、DMEM、F12-K 等培养液为佳,细胞接种量为 $10^4 \sim 10^5$ 个/ml。T-25 瓶加 8～10ml 培养液。T-75 瓶加 12～15ml 培养液。如培养液 pH 过高或者培养细胞系的需要,可向瓶内通入 5%的无菌 CO_2 气体,拧紧瓶盖。

(2) 培养　单层细胞通常在普通温箱(37℃)培养即可。

(3) 传代

① 移去细胞培养瓶中的培养液,加入适量的胰酶消化液(T-25 瓶加 1ml,T-75 瓶加 3ml),拧紧盖子,缓缓转动瓶子,让胰酶

均匀铺满细胞单层。

② 于37℃培养，时间视细胞不同而定：Hela细胞1～2分钟，MDCK10～20分钟。作者掌握消化时间是以细胞松散脱壁即可。

③ 从37℃取出消化脱壁的细胞瓶，于操作台上加入生长培养液（T－25瓶加3ml，T－25瓶加6～8ml），用10ml吸管反复吸打，使细胞充分分散，即可常规传代。与传统的细胞传代程序不同，作者省去了细胞单层在加胰酶前的洗涤和吸出过量胰酶的程序，使操作较为方便、简单，且可避免污染。传代细胞中存在过量的胰酶不影响其生长，因培养液中的血清具有对胰酶灭活的作用。

（4）调整细胞的生理状态　将用于冻存的细胞培养至85%～90%的单层，更换培养液。继续培养18～24小时，细胞将达到95%以上的单层。此时，细胞处于对数生长晚期，用于冻存时效果甚佳。

三、动物细胞的冻存

（一）冻存前的准备

（1）镜检待冻存的细胞瓶，观察细胞的形态、健康状况及是否有污染源存在等。

（2）填写细胞冻存表格，记录细胞的冻存编号、冻存安瓿数量等。

（3）冻存管编号，注明冻存日期和冻存编号等。

（二）收集细胞

（1）悬浮培养细胞直接离心收集细胞，转速为1000r/min。

（2）单层培养细胞按前述的方法用胰酶消化，离心收集细胞。

（三）计数

离心收集的细胞用适量的生长培养液充分悬浮，制成单个细胞悬液，取样用血球计数器计数，细胞数控制在5×10^6～1×10^7个/ml。

（四）冻存液悬浮细胞

将计数的细胞悬液与冻存液（10%～20%DMSO）1∶1（V/V）充分混合。单细胞悬液对冻存极为重要。

（五）分装冷冻管

细胞悬浮液以每支冷冻管分装 1ml 为宜，分装的时间要尽可能快，尽量减少在室温的停留时间。如细胞冻存安瓿过多，可采用冰浴降温，减少 DMSO 的毒性作用。

（六）冻存

（1）细胞管存放于 4℃20～30 分钟，使 DMSO 充分渗透到细胞内，达到内外平衡。

（2）细胞管平衡后，移至程控降温仪冷冻室内程控降温。

（3）降温速率控制在 -1.0℃/min 降到 -30℃，-5.0℃/min 降到 -100℃以下，迅速将冷冻细胞管投入液氮冻存。

（4）无程控降温的实验室，可采用于 4℃20 分钟、-70℃预冻过夜的方法降温。细胞冻存的全过程如图 8-4 所示。

（七）记录

细胞冻存管投入液氮后一定要及时记录，建卡存档（作者使用的记录卡和表格附后）。

四、冻存细胞的复苏

（一）细胞解冻

从液氮中取出细胞冻存管（从液氮中取细胞冻存管时要戴面罩、防冻手套），投入 37～40℃水浴中，摇动管子使细胞完全解冻（约 1 分钟）。

（二）检测

（1）细胞活性检测　采用胎盼蓝检测死、活细胞百分率，用培养法测定细胞生长率。

（2）细胞特性检测　细胞复苏后常规培养，检测其特性，如产生单抗的能力、基因表达的特性等。

（3）其他项目检测　按细胞质量控制方法，检测其他项目。

五、动物细胞冻存的标准化管理

CCTCC 设计了多种表格，常规用于动物细胞冻存，检测记录。表格记录方便、简单，非常实用。使用表格记录的优点在于实现标准化、规范化的管理。对于贮存细胞较多的实验室或细胞库，规范化管理是工作顺利进行的可靠保证。

图 8-4　细胞培养物冻存图解

注：CCTCC 用程控降温仪替代 -70℃ 预冻

（一）细胞培养物冻存的几种表格

表 8-1　　细胞冻存程序表

日期_____

操作者_____

冻存编号:_____ CCTCC 号:_____ 细胞名称:_____

传代次数:_____ 培养胞龄:_____ 培养液:_____

最后一次换液时间:_____ 培养容器及数目:_____

冻存保护剂液:_____ml DMSO+生长培养液_____ml

细胞收集程序:_____

(1) 细胞悬液总体积:_____ml (2) 离心转速(r/min)_____

(3) 冻存细胞悬液总体积:_____ml

(4) 加入冻存管的细胞体积_____ml

(5) 冻存总细胞管数_____支 (6) 细胞管4℃平衡_____min

细胞冰冻程序:_____

_____

细胞液氮贮存:液氮容器_____区_____格_____夹子_____

细胞计数:

每毫升细胞数:_____

细胞活性(%):_____

表8-2 细胞检测的记录表

细胞冻存前微生物检测结果

培养基日期	7天	14天	21天	备注
SDB(28℃)				
BHI(37℃)				
THIO(37℃)				
TSB(37℃)				

细胞冻存前后支原体检测结果

方法/结果	阴性	阳性	备注
直接培养			
DNA荧光染色			

操作者_____

表8-3 细胞冻后复苏检测记录表

细胞名称:_____ 检测日期:_____

细胞冻存编号:_____ 操作者:_____

细胞复苏管号:_____

生长培养液:_____微生物检测(ml):_____

支原体检测(ml):_____生长培养T-25:_____ml,T-75:_____ml

微生物检测结果

培养养 14～21 天	37℃观察日期	+/−	25℃观察日期	+/−
BHI				
THIO				
TSB				
SDB				
血液琼脂				
血液琼脂(厌氧)				

计数结果

每毫升细胞数:_____

细胞活性(%):_____

支原体检测结果

记录表 8－2(2)

表 8－4　　细胞冻存登记卡

贮存登记卡

细胞冻存编号_____液氮容器_____区_____格_____夹_____,细胞名称_____管数_____冻存日期_____生长培养液_____血清_____冻存保护剂液_____冻存程序_____

操作者_____

细胞复苏登记卡

细胞总数(支)	复苏日期	复苏管数(支)	剩余细胞管数(支)	细胞贮存位置

操作者_____

§8.4 细胞培养物冷冻保存质量控制范围与检测项目

细胞学家根据动物细胞的形态特征，将动物细胞分为四大类：似上皮状细胞、似成纤维状细胞、似淋巴状细胞和混合型细胞。尽管这些细胞形态有时会因培养条件、培养液中营养状况好坏而发生改变，但在特定条件下，它们的形态特征是稳定的，尤其不会因动物的种属差异带来形态上的不同。例如，不管是老鼠的上皮细胞还是人的上皮细胞，其细胞形态是相似的，一般难以在光学显微镜下通过形态学特征鉴别不同种属的同一类细胞。所以在细胞培养物冷冻保存质量控制中，动物细胞形态对鉴别种属间交叉污染时是无意义的。另外，细胞培养物冷冻保存质量优劣还涉及培养液、添加剂及低温保护剂的质量控制，还要保证保存的细胞无任何污染源存在。这就给动物细胞冷冻保存的质量控制带来很多麻烦，需要采用多种的检测手段才能保证细胞的优良品质。下面介绍的这些细胞质量控制方法，包括了几种经典的方法，如常规的微生物污染检测，培养液、血清的质量控制，染色体分析，同工酶分析；改良更新的支原体检测法，如 DNA 荧光染色检查，标记探针测定法；近几年发展起来的分子生物学方法，如标记 DNA 杂交，DNA 指纹图谱分析，PCR 技术等。实验室的研究人员可根据本地的条件、仪器设备、检测项目，选择有关的方法。

一、培养液、添加剂及低温保护剂的质量控制

（一）培养液

细胞培养液是一种人工制备的营养基质，它能在体外有效地支撑不同类型细胞生长、繁殖。培养液的成分包括细胞生长所必需的氨基酸、糖、脂类化合物、维生素、生长因子、无机盐和水分。市售的细胞培养液有十几种之多，它们适合不同研究目的各种细胞生长需要。

细胞培养物冷冻保存的目的：其一要使细胞有较高的存活率

(一般90%以上),其二要保持细胞的生理、遗传特性的稳定。为此,细胞的培养与保存的关系是紧密的,只有制备优质的细胞培养物,才能达到最佳的保存效果。所以培养液的选择与质量控制是细胞培养的关键。现将培养液的制备方法简介如下:

(1) 参照商业产品说明书的要求,用双蒸水充分溶解粉状的培养液,加入适量的 $NaHCO_3$,调节至 pH7.2,添加 10% 的 FBS (Fetal Bovine Serum),充分混匀。如 pH 高于 7.2,可通入 CO_2 气体调节 pH。

(2) 采用 Millipore 过滤装置(图 8-5)过滤培养液。将过滤装置置于生物安全台台面上,用紫外线照射半小时,过滤前将培养液用 PVC 管与过滤器上端连接。

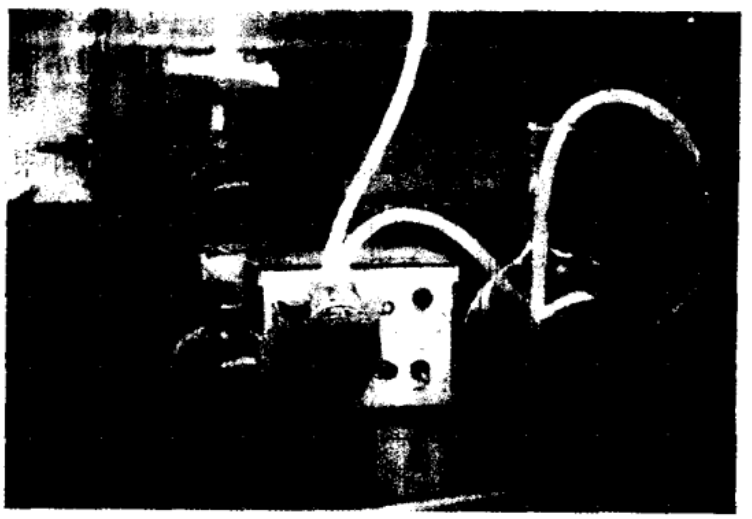


图 8-5 CCTCC 使用的 Millipore 过滤装置(Millipore Co. USA)

(3) 打开过滤泵电源,用无菌的容器(250ml、500ml 平底烧瓶)接收过滤后的培养液,用胶塞塞紧瓶口,盖上铝箔纸。

(4) 过滤期间,取样作无菌试验,观察 2~3 周,结果为阴性可使用。

(5) 将培养液瓶贴上标签,注明培养基类型、血清浓度、批号、过滤日期,于 4℃贮存。

(6) 取样测定培养液的渗透压,渗透压在 300～330mOsm/kg 为合格。

(二) 血清

Mckeehan 对细胞培养液的选择提出很高的标准,强调选择细胞培养液配方时,要考虑各种因素以及有关添加剂与环境变化的关系。而 Umbreit 等则进一步对细胞培养液中 $NaHCO_3$ 浓度、pH、CO_2 浓度与温度之间的关系作了全面报道。这些因素都是培养液质量控制需要考虑的问题。考虑篇幅有限,主要介绍添加血清的质量控制方法。细胞培养液中通过添加牛血清、马血清、人血清,细胞才能正常生长,而牛血清是最常用的血清。

(1) 血清的选择　血清中含有细胞生长所必需的营养物,对培养液有很强的 pH 缓冲作用。单层细胞培养时,血清有促进细胞贴壁的作用。但有的血清对细胞呈现毒性作用,这种毒性作用与血清中所含的脂蛋白,特别是胆固醇有关,使用血清必须严格检验,精心挑选。

牛血清(新生牛血清、胎牛血清)的选择方法,可根据研究目的、培养细胞类型、血清来源而定。CCTCC 细胞库使用的血清经过严格挑选,反复进行细菌、真菌、支原体及某些病毒存在的检测,以标准细胞克隆分析和生长测定结果,确定血清使用批号、厂商。通常选购二种规格的血清:一种是胎牛血清(FBS),主要从美国 Sigma, Gibico 公司购进;第二种是新生牛血清(Newborn Calf Serum, NCS)和少量胎牛血清,来源于杭州四季青生物工程公司。无论进口血清还是国产血清都要进行严格的测定。

(2) 血清纯度检测　虽然血清生产厂商在出售前已检查过产品质量,但是 CCTCC 在订购前,对使用批号的血清要作无菌试验、支原体检测,测定结果阴性者为合格。

(3) 标准细胞生长测定　选用标准的细胞系 WI－38(CCTCC－GDC016)、Hela(CCTCC－GDC009)、MRC－5(CCTCC－GDC032)、MDCK(CCTCC－GDC012)作生长测定。分别以不同数目的标准细胞接种含一定牛血清浓度的生长培养液中,用细胞

的生长状况来评估血清的质量。测定容器用培养瓶，或用24孔培养板。

① 选用对数生长的各标准细胞培养物，用常法制备细胞悬液，浓度为每毫升10^6～10^7个。

② 按10倍稀释法稀释细胞悬液，制成10^{-1}～10^{-7}的一系列稀释度，于各稀释度取样1ml接种至含检测血清的生长培养液中(2～3重复)，于37℃培养。

③ 视细胞生长情况更换培养液，一般只换一次。12～14天后，弃上清，用10%福尔马林液固定细胞，用自来水冲洗数次，再用1% toluidine blue水溶液染色1～5分钟。

④ 弃染液，用自来水冲洗数次，在显微镜下观察细胞生长情况，记录每稀释度的细胞克隆数目、大小、类型，以细胞克隆数目、大小、类型评估测定血清的质量。

⑤ 选择血清质量合格的批号、厂商，批量购买，贮存于－70℃冰箱备用。

(三) 其他添加剂

通常情况下，细胞生长培养液中除添加牛血清外，还要添加少量的生长因子、谷氨酰胺、抗生素等。这些添加剂都不能高压灭菌，需采用微孔滤器过滤除菌，检验合格方可使用。

(四) 低温保护剂

细胞培养物的低温保存必须使用保护剂。二甲亚砜和甘油的使用浓度是5%～10%，以10%为佳，必须选用优质试剂纯。在细胞冷冻保存中，甘油使用较方便，按5～10ml/瓶小量分装，121℃高压灭菌2次即可使用。二甲亚砜不宜高压灭菌，用0.22μm的聚四氟乙烯(FGLP)滤膜过滤，过滤前用乙醇洗滤膜，再用少许二甲亚砜洗过。将过滤后的二甲亚砜小量分装，于4℃避光贮存。贮存的保护剂应标明来源、产地、批号、除菌时间。优质的二甲亚砜应是无色透明的，20℃以下呈结晶状态。呈淡红色状的二甲亚砜不宜使用，应丢弃。作者选购美国ATCC过滤分装(5ml/支)的二甲亚砜，使用方便，质量可靠，可作为各种细胞的低温保护剂。

二、细胞培养物冷冻保存的质量控制

(一) 细菌和真菌污染的检测方法

细胞培养过程中污染细菌和真菌的问题,在组织培养方法建立的早期就被发现,它曾一度严重危害组织和细胞培养。尽管抗生素的问世,使细胞培养物中微生物的污染得到控制,但污染源始终存在。对于作短期细胞学特性研究工作,或者仅以细胞培养物为实验材料的其他研究,抗生素的应用抑制了污染微生物的生长,短期似乎不影响工作。然而,以保存细胞种子为目的的细胞保存室、细胞库和一些实验周期长、研究要求在无抗生素的条件下进行的项目,一般不推荐在细胞培养液中加抗生素,使微生物的污染在短期细胞传代中反映出来,消除了细胞培养物中残存污染物的潜在危险。尤其是细胞培养物低温保存时,不宜加抗生素。所以在细胞培养物培养、保存的各个环节进行微生物污染的检测应是常规性的工作。常规检测时,采用五种类型的培养基,它们适应不同种的细菌和真菌的生长,可以达到预期的检测目的。

(1) 培养基的配制

① SDB 培养基(Sabouraud dextrose broth, Difco 0382-01):

A) 称取 30.0g 无水培养基粉剂于 1000ml 双蒸水中加热溶解,pH5.6(自然 pH)。

B) 分装培养基 10ml 到 18mm×180mm 试管中,盖上管帽,121℃高压灭菌 20 分钟,贮于 4℃备用。

② THIO 培养基(Thioglycollate, Difco 0256-01):

A) 称取 29.8g 无水培养基粉剂于 1000ml 双蒸水中加热溶解,调 pH7.2。

B) 分装培养基到 18mm×180mm 试管(10ml/支),盖上管帽,121℃高压灭菌 20 分钟,贮于 4℃备用。

③ TSB 培养基(Trypticase soy broth, BBL-01-162):

A) 称取 30.0g 培养基粉剂于 1000ml 双蒸水中加热溶解,调 pH7.3。

B) 分装培养基到 18mm×180mm 试管(10ml/支),盖上管帽,

121℃高压灭菌20分钟,贮于4℃备用。

④ BHI培养基(Brain heart infusion broth, Difco 0037－01－6):

A) 称取37.0g培养基粉剂于1000ml双蒸水中加热溶解,调pH7.4。

B) 分装培养基到18mm×180mm试管,盖上管帽,121℃灭菌20分钟,于4℃贮存备用。

⑤ Blood琼脂培养基(blood agar base, Difco 0045－01):

A) 称取40.0g培养基于950ml双蒸水中加热溶解,调pH7.2。

B) 培养基于121℃高压灭菌20分钟,冷至50℃左右,加入50ml(5%)质量合格的新鲜脱纤维兔血,混匀。

C) 无菌分装到9cm平皿中(20ml/皿),血液平板包装后贮于4℃备用。

新鲜兔血无菌检测:将0.5ml新鲜兔血加到BHI、SDB培养基中,于37℃和26℃分别培养48～72小时,阴性结果证明兔血合格。

(2) 培养基无菌检测　分别取5种灭菌后的培养基2支,于25℃、37℃培养1周,核实为阴性者即可使用。

(3) 细胞培养物、培养液、血清的无菌检测

① 吸取每批待检样品0.3ml,接种5种培养基:SDB 2支;BHI 2支;blood琼脂平板2个;THIO 2支;TSB 2支。

② 培养:blood平板1个于37℃常法培养,另一个于37℃厌氧培养。SDB、BHI、THIO、TSB各取一支于25℃培养,另一支于37℃培养。

③ 观察结果:所测定的培养管、平板观察2～3周。如果平板上长出菌落,或培养管的培养基变混浊或出现肉眼可见的菌丝体,则说明待检样品被细菌或真菌污染,为阳性结果。重复检测阳性结果的样品,进一步确定污染。如果平板上无菌落生长,或培养管的培养基清亮透明,为阴性结果,说明待检样品无细菌和真菌污染源存在。

（二）支原体污染的检测方法

支原体是一类无细胞壁的原核生物。由于其缺乏细胞壁，有可塑性，故在形态上呈多形性，且可通过一般细菌滤器，是目前所知能在培养基质中生长繁殖的最小微生物。支原体是细胞培养中常见的一种不易避免的污染物，已经引起各国学者的高度重视。美国组织培养协会甚至提出，呈交到其协会刊物“In Vitro”发表的论文，凡实验材料涉及细胞培养物的，都要求提交有关支原体污染检测结果证明，否则文章的实验结果是不可靠的。

目前已知的支原体有 80 余种。Giudice 经过 13 年之久的研究，证明细胞培养物中污染的支原体主要分两属 4 个种：精氨酸支原体（*Mycoplasma arginini*）、猪鼻支原体（*Mycoplasma hyorhinis*）、口腔支原体（*Mycoplasma orale*）、莱氏无胆甾支原体（*Acholeplasma laidlawii*）。它们污染各种细胞培养物，其培养物上清液中支原体的滴度可高达 $10^7 \sim 10^8$/ml。被污染的细胞培养物，其生物学性状不同程度地发生改变，表现为细胞异常；代谢紊乱；正常的蛋白质、核酸合成受抑制；染色体发生变异；细胞膜酶系统部分受阻，表面膜抗原结构损伤；骨髓瘤细胞的融合力降低等。支原体的污染，给细胞培养物的研究、应用、保存带来严重危害。为此，70 年代中期以后，细胞培养物中支原体污染检测已作为细胞质量控制的项目之一。

支原体污染检测的常规方法包括微生物学直接固体琼脂培养法和 DNA 荧光染色间接测定法，以及近几年发展的 DNA 探针杂交法。DNA 探针检测灵敏度高，精确性好，具有广阔的应用前景，推荐有条件的实验室和细胞库使用。对于一般实验室的支原体检测，前两种常规方法同时使用，足可以无误地检测出污染的各种支原体。

一个新细胞系的入库冻存过程中，至少要在 3 个不同时期进行间接和直接的支原体污染检测。现已证明，污染细胞培养物的猪鼻支原体，60% 以上不能被微生物固体琼脂培养法直接检出。所以，检测试验务必采用直接法和间接法同时并举。CCTCC 一直

采用这两种方法检测细胞培养物中支原体的污染，控制细胞冻存入库质量，获得稳定的结果。

（1）微生物学直接固体琼脂培养法（直接法） Barile 等认为，此法是分离、检出和鉴定支原体的最佳方法之一。采用适合支原体生长繁殖的基础营养成分，补加酵母浸汁、动物血清，以 2% 的琼脂制成固体平板，接种待检样品，微厌氧培养 2～3 周，在显微镜低倍物镜下观察，阳性结果为可见典型的支原体菌落，呈油煎鸡蛋样。

① 培养基制备：

A）称取 23.8g 支原体琼脂培养基粉剂（Becton－Dickinson 11458）加到 700ml 双蒸水中，搅拌加热至沸腾使之溶解，调至 pH7.4。

B）121℃ 高压灭菌 20 分钟。灭菌后的液体琼脂放入 50℃ 水浴中，使其恒温。取 200ml 马血清（北京生物制品所）、100ml 酵母浸汁（Oxoid England）置于 50℃ 水浴中使温度平衡。

C）用无菌操作，迅速将马血清、酵母浸汁加入灭菌的琼脂液中，混匀。

D）立即倒平板（采用规格为 6cm 的平皿，10ml/皿），平放于干净的工作台面上，待平皿中琼脂凝固。

E）用无菌的铝制盒装琼脂平板，外包高压消毒袋，防止水分蒸发，贮于 4℃ 备用。

② 待测样品接种：

A）选择近 3 天内没有换液而又接近长满的细胞培养物，采用无菌操作刮下部分单层细胞（悬浮培养的细胞可直接加样），制成细胞悬液。

B）接种 0.2ml 待测细胞悬液到琼脂平板上，转动平板使液体均匀流散。

C）将琼脂平板垒放在小型厌氧罐的支架上，取一袋催化剂固定于厌氧罐顶盖的夹子上；另取一袋气体发生袋，剪去右上角，加 5ml 双蒸水，立即放入厌氧罐内，拧紧盖子，置于 37℃ 培养。

D）琼脂平板培养3周，每周镜检一次，反复检查整个平板，避免漏检，阴性结果无菌落出现，阳性结果为可见典型的油煎鸡蛋状的菌落（图8－6）。

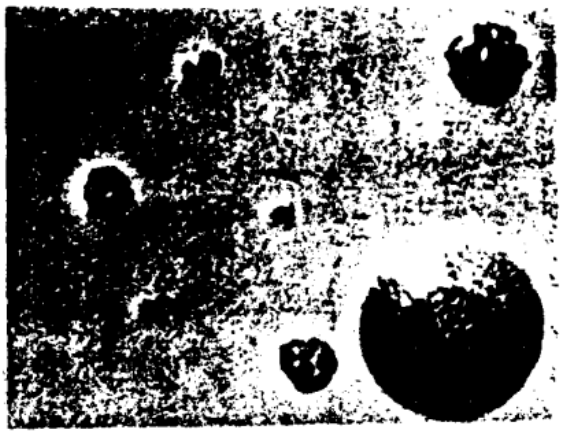


图8－6　支原体的菌落形态（油煎鸡蛋状）

（2）DNA荧光染色法（间接法）　Hoechst 33258荧光染料可特异性地使DNA染色，在污染支原体的细胞核表面形成支原体DNA荧光染色颗粒，用荧光显微镜能有效检出支原体的存在。此法由郑昭仁（1977年）首创，是一种简单、快速、易掌握的支原体检测法。配合固体琼脂培养法，能检测出细胞培养物中污染的各种支原体。目前，ATCC、ECACC、CCTCC仍使用此法常规检测细胞培养物中污染的支原体，检出率在98%以上。

DNA荧光染色法需用继代细胞作为指示细胞，CCTCC使用的指示细胞有Vero细胞、NIH3T3细胞。不推荐转化细胞作为指示细胞，因为它们产生大量的核背景荧光，影响结果的解释。指示细胞用于DNA荧光染色程序有两个好处：首先，指示细胞系有利于那些需要复杂营养的支原体种类的生长；其次，无论阳性还是阴性对照，都易与待测细胞样品的结果进行比较。

① 浓缩染液的配制：

A）称取5mg的Hoechst 33258（American Hoechst CO. USA）荧光染料、10mg硫柳汞（thimersol），加入100ml无酚红的Hank's平衡盐溶液中。

B）室温下，磁力搅拌30～45分钟，使其充分溶解。

C）染料对热和光敏感，必须在一个完全用铝箔包严的棕色瓶中配制。小量分装（2～3ml/支）后，贮于－20℃以下。

② 封片液的配制：

A) 取 0.1mol 的柠檬酸 22.2ml、0.2mol 磷酸二钠 27.8ml、甘油 50ml，混匀，调至 pH5.5(封片液的 pH 值非常重要，直接影响荧光观察)。

B) 贮存于 4℃冷库备用。

③ 指示细胞的制备和待测样品接种：

A) 将 6cm 平皿、盖玻片洗净，烘干，分别包装，160～180℃干热灭菌 2 小时。

B) 无菌条件下，打开平皿，用无菌镊子取盖玻片放入中心部，加入 3mlDMEM 培养液到每个平皿中(DMEM 加 10%小牛血清、100u/ml 的青霉素和 100μg/ml 的链霉素)。加液时要保证盖玻片完全浸泡在培养液中。

C) 将 Vero 细胞或 3T3 细胞制成细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml，每皿加细胞悬液 1ml。

D) 将接种细胞的平皿置于 37℃、5% CO_2、95%饱和空气的 CO_2 培养箱中培养过夜。

E) 用显微镜检查证实细胞已贴在盖玻片上，在平皿上编号，标明接种日期。

F) 阴性对照皿加 DMEM 培养液 0.5ml；待检皿加入待检样品 0.5ml，每份样品至少两个重复皿；阳性对照皿，每皿加 0.5ml 支原体悬液。

G) 将培养皿放回 CO_2 培养箱中，培养 1 周。

④ 固定、染色和封片：

A) 染色液配制。加 0.5ml Hoechst 33258 染料浓缩液到 50ml 无酚红的 Hank's 平衡盐溶液中，用铝箔密避搅拌 30～45 分钟。

B) 取出培养的平皿，吸弃上清液，每皿加 5ml 固定液(乙酸：甲醇＝1:3)固定 5 分钟。弃固定液，加新鲜固定液固定 10 分钟。

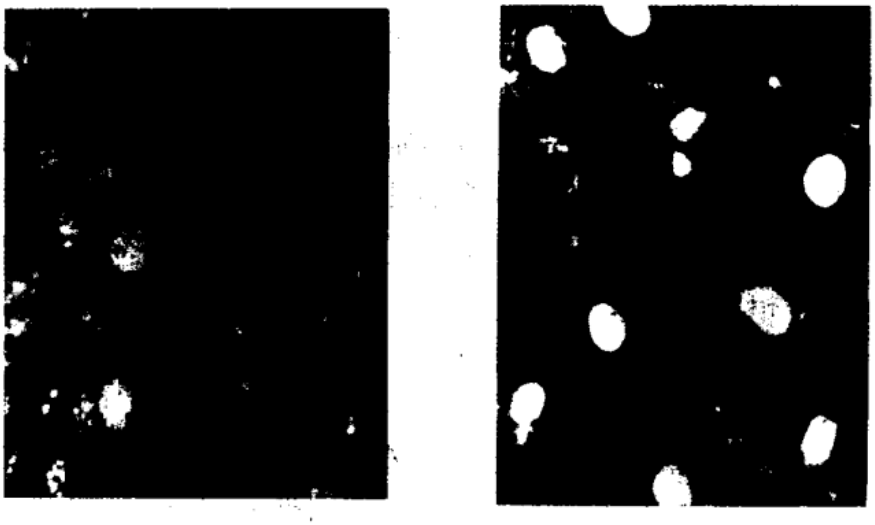
C) 弃固定液，让细胞空气干燥，加入 Hoechst 33258 染色液 5ml，盖上平皿盖，室温染色 30 分钟。

D) 吸出染色液，用 5ml 双蒸水洗平皿 3 次。第 3 次洗涤后，

吸干盖玻片上的水分，空气干燥片刻。

E）滴一滴封片液于洁净的载玻片上，用镊子从平皿中取出带样品的盖玻片，将有细胞的一面盖在封片液上，补加一滴封片液于样品盖玻片上，用一块更大的盖片盖上，轻轻挤压封片液，排除滞留的气泡。

F）贴上标签，用400倍荧光显微镜观察每张玻片标本，记录结果。注意：初次观察难于判断结果，建议反复观察阳性和阴性对照，比较其差异（图8－7）。



A. 阴性对照　　B. 阳性对照

图8－7　支原体DNA荧光染色的结果

（3）DNA探针杂交试验（间接法）　核酸杂交试验是根据单股的核酸具有互补能力，可与靶核酸形成稳定的双链复合物的原理而设计。细胞培养物中支原体污染快速检测基因探针，采用^{3}H标记单股DNA探针，该探针在反应中与靶细胞的核糖体RNA（rRNA）互补。当rRNA从靶细胞中释放，^{3}H－DNA探针与其结合，形成稳定的DNA:RNA杂交分子。从未杂交的DNA探针中分离带^{3}H标记的DNA:RNA杂交分子，加入闪烁液，可通过闪烁计数器计数。实验结果的评估是计算杂交百分率，与阳性、阴性结果比较，确定样品中支原体污染状况。

① Gen－probe 公司试剂盒：

A) 探针溶液：^{3}H 标记的支原体 DNA 探针，放射活性不低于 222kBq/每管(1×4ml)。

B) 分离上清液：羟磷灰石(hydroxyapatite)缓冲液，含 0.02% 叠氮钠(1×100ml)。

C) 洗涤液：含 0.02%叠氮钠的缓冲液(1×200ml)。

D) 阳性对照：非感染性支原体核酸液，含 0.02%叠氮钠(1×1ml)。

E) 阴性对照：含 0.02%叠氮钠的缓冲液(1×1ml)。

F) 闪烁液：生物降解液，非易燃性液体闪烁液。

G) 泡沫浮架 2 支，微量离心管 20 支。

② 其他：

A) 闪烁管(7ml 塑料管，带螺旋帽)。

B) 水浴(72℃ ± 2℃)，离心机，微量进样器(50～200μl)，吸管，巴斯德吸管，闪烁仪等。

③ 操作程序：

A) 对照的制备(试剂盒中提供的微量离心管用于标本和对照的分析)：

(a)加 50μl 阳性和阴性对照液到相应的微量离心管中。

(b)加 200μl 探针液到上述对照管中，拧紧管帽，旋转片刻，避免液体溢到管帽上。

B) 样品制备：Gen－probe 系统用来检测细胞培养物中污染的支原体。检测试验可在生长的细胞培养物中进行，甚至含抗生素培养也不影响实验。由于抗生素的存在会降低支原体的水平，所以最佳的操作还是将细胞系在无抗生素的培养液中传代 2 次以上，以增强检测的敏感性。一般情况下，制备的待测样品可在 4℃贮一周，使用前如发现样品明显地混浊，则估计是微生物的污染，应废弃样品。

(a) 吸取 1.5～2.0ml 细胞培养上清到一支圆锥形微量离心管中。

(b) 于 12000～15000×g 离心 10 分钟，用巴斯德吸管移去全部上清。因沉淀物极微量，移上清时要小心操作，避免吸取沉淀。

(c) 加 200μl 探针液到样品管中，拧紧管帽，缓缓转动管子使沉淀悬浮。

C) 杂交：

(a) 放样品管和对照管(阳性、阴性对照)到泡沫浮架的相应孔中，使管帽上部露出泡沫平面，置泡沫浮架于 72℃ ±2℃ 的水浴中反应 2 小时以上。

(b) 反应期间，分别吸 5ml 充分悬浮的分离悬液到 3 支 7ml 螺旋帽闪烁管中。分离悬液必须充分混匀，保证每管的浓度相同。

D) 本底(background)的计数：试剂盒中提供的闪烁液须进行本底计数，用后的本底管保存于试剂盒中供以后每次试验使用。

(a) 吸 5ml 闪烁液到一支 7ml 螺旋帽塑料管中。

(b) 放置至少 5 分钟，于闪烁仪上计数 1 分钟，测得的数值是每分钟的本底计数(CPM/min)。

E) 总计数：

(a) 加 5ml 分离悬液到闪烁管中，500×g 离心 1 分钟，弃上清，小心操作，勿弃掉沉集物。

(b) 加 50μl 探针液到沉集物中，另加 5ml 闪烁液，拧紧管帽。旋转管子，使沉集物充分悬浮。

(c) 放置 5 分钟以上，于闪烁仪上计数 1 分钟，记录 CPM/min。计算总计数值：

$$\text{总计数值} = (\text{CPM/min} - \text{本底 CPM}) \times 4$$

用 50% 有效率的闪烁计数仪测定，总计数值至少应达到 170000CPM，即相当于每分钟 340000 裂变值(DPM)。

F) 分离程序：

(a) 杂交反应结束，从水浴泡沫浮架上取出反应管，吸出每管中的全部反应物到含有 5ml 分离液的螺旋帽塑料管中(前面杂交(b)已制备)，拧紧管帽，充分混匀。

(b) 将反应管放回 72℃ 水浴泡沫浮架孔中，保温 5 分钟。

(c) 取出反应管,充分混匀,于 500×g 离心 1 分钟,弃上清。

(d) 按下法洗涤沉集物 2 次:加 5ml 洗液到反应管中,盖紧帽,充分混匀,放反应管回 72℃ ±2℃ 水浴浮架孔中,保温 5 分钟。取出反应管,旋转 10 分钟使其充分混匀,500×g 离心 1 分钟,弃上清。

G) 测定:

(a) 加 5ml 闪烁液到每支样品管和对照管中,拧紧管帽,充分混匀。用吸水纸包裹待测管,放入闪烁计数仪中。

(b) 静置 5 分钟,每管计数 1 分钟,获 CPM/min。

④ 结果解释:

A) 样品:杂交百分率大于或等于 0.4% 为阳性结果,证明样品中存在支原体污染物。

样品杂交百分率计算公式如下:

$$\text{杂交}(\%)=\frac{\text{样品 CPM}-\text{本底 CPM}}{\text{总计数 CPM}}\times 100\%$$

B) 对照:阳性对照值大于或等于 30%。阴性对照值小于或等于 0.2%。

Gen－probe 试剂的敏感性受样品的体积、支原体浓度和杂交反应时间的影响。如初次试验结果误差过大,可增加反应的样品体积,提高待测样品的浓度,延长杂交反应时间(2～20 小时),从而提高 Gen－probe 系统的敏感性,以减少测定结果的计算误差。

(三) 病毒污染的检测方法

病毒是一种无完整细胞结构的微生物,它的生长、繁殖都必须在宿主细胞内进行。正常细胞被病毒感染,细胞将引起病变,过早地裂解或死亡。所以细胞培养、低温保存过程中,病毒的污染也是一个令人头痛的问题。然而,由于病毒感染宿主细胞具有高度的专一性,所以对于某种病毒而言,其感染宿主细胞的机率就小得多,它不像其他微生物那样广泛感染培养的细胞。也正是由于病毒感染的高度专一性,使得细胞被感染呈现多样化,形成感染的内源性和外源性,检测方法比较复杂,往往不是一两种方法就能解决

问题。ATCC 采用多种方法检测细胞培养物保存中的病毒污染源，下面将介绍几种主要的方法。

(1) 新建细胞系的噬斑(CPE)检测

① 定期取出正在培养的细胞，让光线透过单层细胞，查看噬斑、集落或生长不规则区域。

② 尽可能利用倒置相差显微镜，逐个检测培养细胞，特别要注意细胞群体形态学不均匀的区域。

A) 用低倍物镜观察待检细胞，有可疑之处，弃培养上清，用中性缓冲的福尔马林液固定。

B) 制备湿片，用高倍镜观察，并作必要的照相，以便分析。

(2) 血细胞吸附试验

① 接种细胞培养物，培养 2～3 天，使其形成致密单层。

② 分别采集新鲜的肝素抗凝全血(鸡血、豚鼠血、人 O 型血)，1000r/min 离心 10 分钟，弃上清。沉集的红细胞用无钙镁的 Hank's 溶液洗涤 3 次，用生理盐水悬浮，制成 0.5%(*V*/*V*)的红细胞悬液。

③ 待检细胞弃上清液，用无钙镁的 Hank's 液洗涤 2 次。

④ 分别加 3 种红细胞悬液 0.5ml 到待检细胞瓶中，于 4℃ 放置 20 分钟。

⑤ 观察红细胞凝集和吸附现象。不呈现红细胞吸附的细胞，需重复进行(2)～(4)的操作。阳性对照可在试验前 2～3 天，用 0.2ml 未经稀释的流感病毒株感染 RhMk 细胞。

(3) 鸡胚试验

① 选择 10～12 日龄鸡胚，置于无菌操作台上，用电钻或圆锉在胚蛋的气囊端(钝端)钻一小孔。每次操作前后，均用 70% 的酒精擦拭钻孔区域。钻头、锉刀均用 70% 酒精消毒。

② 用烛光灯照射确定血管发育区域，避开胚蛋侧面血管，小心钻孔(人工气室孔)，注意保持壳膜的完整性。

③ 滴 2～3 滴 Hank's 液于胚蛋侧孔内，用无菌针头小心穿透壳膜。此时，Hank's 液将渗入到绒毛尿囊膜(CAM)上，壳膜分

开。

④ 用一根短橡皮管一端插入口中，另一端压住蛋的钝端气囊孔口，用口轻轻地吸气，直到绒毛尿囊膜上人工气室形成。

⑤ 鸡胚接种：

A) 用常法制备待检细胞悬浮液，调整细胞浓度为 3.0×10^7 ～5×10^7 个/ml。

B) 将胚蛋置于无菌操作台上，揭去形成人工气室的胚蛋孔上的胶布，注射 0.2ml 细胞悬液到每个蛋的绒毛尿囊膜的人工气室上(一般作 5～10 个蛋的重复)，封口，继续于 37℃ 培养。

C) 接种后的胚蛋于 37℃ 培养 1 天，利用烛光灯检查鸡胚，弃去死胚。定期检查 8～10 天。

D) 培养结束，如胚胎明显可见，将胚蛋的人工气室处打开，仔细检查绒毛尿囊膜上有无水肿、细胞群落或痘斑。同时检查胚胎的发育状况，有无体态异常、畸形发育障碍。

⑥ 结果分析：

A) 如胚胎发育正常，绒毛尿囊膜上无任何病变迹象，为阴性结果，说明待检细胞无病毒污染源存在。

B) 如有病毒污染的迹象，为阳性结果，重复进行新的鸡胚接种观察。

C) 阳性对照病毒：流感病毒、新城疫病毒、劳氏肉瘤病毒。

(4) 牛腹泻病毒(BVDV)的检测方法　细胞培养中添加的牛血清具有携带外源病毒的潜在危险，尤其是牛腹泻病毒(BVDV)的存在很普遍，因此培养的细胞被 BVDV 污染，仍有明显的可能性。所以要选用严格的检测方法，控制牛血清的质量，消除细胞培养中 BVDV 的污染。应用直接免疫荧光抗体染色，可常规检测市售牛血清中存在的 BVDV。检测中，应该注意到产生 BVDV 结合物和非标记 BVDV 抗体的动物种属，必须与培养细胞来源的动物种属相一致。因为大部分检测系统是异源性的，所以对结合物和非标记血清进行吸收试验是必须的。

① 待检细胞的制备：

A）用常法制备悬浮细胞液，调整细胞浓度为每毫升 2.5×10^5 个，加入待检牛血清（10%～15%）。

B）取一块 Lab－Tek 四室载片，依其产品说明书的要求进行处理，然后于每小室内加入细胞悬液 0.5ml。

C）将载片置 CO_2 培养箱内，于 35～37℃培养，直至单层细胞形成。

② 固定细胞：

A）吸去每小室内的培养上清，用 Hank's 液浸泡漂洗载片，漂洗重复 2～3 次，除去含蛋白的培养液。

B）用滤纸吸去载片上多余的液体，将载片移至－60℃冷存的丙酮中浸泡漂洗 2～3 次，最后一次浸泡不少于 3 分钟。

C）取出载片，使其完全干燥。

③ 染色：

A）用 0.01mol PBS 液（pH7.2～7.4）配制 BVDV 荧光素结合物稀释液。

B）将已固定的四室载片细胞样品放在一个潮湿的容器内（容器内放几块浸湿的滤纸），把结合物稀释液覆盖在载片 1、2 小室的细胞上（每小室 1.0ml）。

C）同时以 1∶5 稀释的非标记 BVDV 抗血清 1.0ml（使用前用 PBS 液稀释）覆盖载片 3 小室的细胞，4 小室用 Hank's 液覆盖。

D）盖上容器盖，置于 35～37℃保温 30～45 分钟。

E）载片用 PBS 洗涤 2～3 次，用结合物稀释液覆盖 3、4 小室的细胞，重新放回潮湿容器，保温 30 分钟。

F）载片用 0.02% 的伊文氏蓝液染色 10 秒，用双蒸水冲洗，空气干燥，从小室中取出载片。

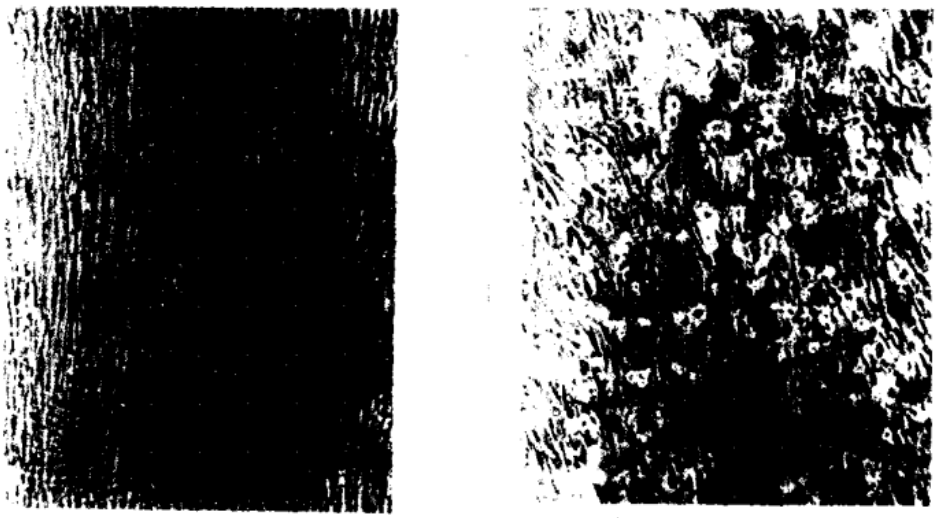
④ 观察：

A）滴一滴用 PBS 配制的甘油（50%）于染色细胞上，然后盖上盖片。

B）于荧光显微镜下观察细胞，检查细胞质中典型果绿色荧光颗粒的存在情况。若载片 1、2、4 上出现荧光颗粒、载片 3 无荧光

颗粒存在，说明细胞中或血清内存在 BVDV。

⑤ 结果评估：直接荧光抗体法是目前检测细胞培养物中 BVDV 污染最敏感的技术。然而，更重要的是结合物的质量，这种质量直接影响特异染色强度和获得最浅的背景着色。可以说，结合物的质量决定着这种染色技术的实用价值。



A、正常的成纤维细胞　　B、病毒感染后的病变细胞

图 8－8　培养的正常细胞和病毒感染后的细胞

（四）原生动物污染的检测方法

细胞培养物中，除了细菌、真菌、支原体、病毒污染外，还要考虑到可能有原生动物的污染。Jahnes 等（1957 年）首次报道了培养的猴肾细胞中“自发”污染了自由生活的阿米巴（Acanthamoeba amoebae）。后来在若干实验室的许多细胞系中已分离出这种原生动物，如狗淋巴肉瘤细胞（Ls30）、Hela 细胞、鸡胚成纤维细胞、Chang 氏肝细胞中，偶尔也可检测到这种有机体。细胞培养物中原生动物污染的检测，可以不作为常规的检测手段使用，仅仅是当细胞出现异常、怀疑原生动物污染时才进行测试。

在检测原生动物污染时，进行细胞学检查及分离都是必要的。这里介绍的原生动物污染检测技术是美国 ATCC 的标准技术，它适合于大多数最普通的有鞭毛或阿米巴样的原生动物的污染检

测。

(1) 溶液和原生动物培养基的制备

① 胰酶－EDTA:

A) 称取 EDTA 0.30g、KCl 0.40g、NaCl 8.0g、葡萄糖 1.0g、$NaHCO_3$ 0.58g、酚红 0.01g 溶于 1000ml 双蒸水中,加胰酶(1∶250,Difco)2.5g,充分溶解。

B) 过滤除菌(0.22μm,Millipore filter),分装于适当容器,贮存于－30℃。

② 无钙、镁 Hank's 平衡盐溶液:

A) 称取 NaCl 8.0g、KCl 0.40g、Na_2HPO_4 0.05g、KH_2PO_4 0.06g、酚红 0.02g 溶于 50ml 双蒸水中,补足水至 100ml。

B) 121℃ 高压灭菌 15 分钟,用灭菌的 0.4*N*NaOH 调 pH 至 7.2～7.4,贮于 4℃。

③ 吉姆萨染液(Giemsa stain):

A) 染色母液:甘油 40ml、甲醇 65ml、Giemsa 粉剂 1.0g,使其充分溶解,过滤 2～3 次,于 4℃贮存。

B) 缓冲液(10×):Na_2HPO_4 6.0g、KH_2PO_4 5.0g 溶于 1000ml 双蒸水,使用前稀释 10 倍即可。

C) 用稀释缓冲液以 3:97 的比例稀释 Giemsa 母液。染色后,弃不用部分。

④ 原生动物培养基:

A) 取 Diamond's TP－S－1 肉汤培养基粉剂(KC Biologicals)溶于 875ml 蒸馏水中,用 1mol/L NaOH 调至 pH7.0,滤纸过滤。

B) 121℃ 高压灭菌 20 分钟。

C) 无菌条件下加入 100ml 灭活牛血清、25mlDiamond's TS－S－1 维生素溶液(40×)(KC Biologicals)。

D) 无菌分装 18mm×180mm 试管(每支 13ml)。

E) Locke's 溶液:称取 NaCl 8.0g、KCl 0.2g、$CaCl_2$ 0.2g、KH_2PO_4 0.3g、葡萄糖 2.5g 溶于 1000ml 双蒸水,121℃ 高压灭菌 20 分钟。

⑤ 双相血琼脂培养基：

A) 称取牛肉 25.0g，加 250ml 双蒸水，搅动煮沸 2～3 分钟，滤纸过滤。

B) 加 Neopeptone(Difco)10.0g、NaCl2.5g、琼脂 10.0g，加热煮沸，滤纸过滤，补双蒸水 500ml，调至 pH7.2～7.4。

C) 121℃高压灭菌 20 分钟，冷却至 50℃。

D) 无菌条件下，加 30%已除菌的脱纤维兔血到培养基中，分装于灭菌试管，摆斜面。

E) 斜面形成后，加 3ml 无菌的 Locke's 溶液。

⑥ Pyb 培养基：

A) 称取蛋白胨 1.0g、酵母浸汁 1.0g、琼脂 20g 溶于 900ml 双蒸水。

B) 于培养基中加入 0.05mol/L $CaCl_2$ 4.0ml、0.4mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 25ml、0.25mol/L Na_2HPO_4 8.0ml、0.25mol/L KH_2PO_4 32ml，补足水到 1000ml，调至 pH6.5。

C) 121℃高压灭菌 20 分钟，倒平板。

⑦ BHI 血液琼脂培养基：

A) 称取 BHI 粉剂 37.0g、琼脂 18.0g 溶解于 1000ml 水中，分装于试管(15mm×150mm，每支 5.0ml)，121℃灭菌 20 分钟，冷却至 48℃。

B) 每管加 0.5ml 灭菌脱纤维兔血，制备斜面。

⑧ NTYG 培养基：

A) 称取 Trypticase 5.0g、酶母浸汁 5.0g、葡萄糖 10.0g 溶于 1000ml 双蒸水，调至 pH7.2。

B) 分装于试管(18mm×180mm，每支 10ml)，115℃灭菌 30 分钟。使用前每管加入 0.2ml 经过透析和热灭活的牛血清、0.1ml脱纤维羊血。

⑨ Leishmania 培养液：

称取柠檬酸钠 1.20g、NaCl 1.0g 溶于 90ml 双蒸水，分装于小试管(每支 1.0ml)，121℃高压灭菌 20 分钟。盐溶液冷却后，加

1.0ml脱纤维兔血，充分混匀，贮于4℃备用。

原生动物生长培养基于4℃可以存放3个月以上，不宜一次制备过量，可根据工作量的大小、检测频繁程度来确定配制培养基的量。

(2) 细胞培养物检测样品的制备和接种

① 用常法复苏冻存细胞安瓿，于适宜的生长条件培养3～5天。在培养期间，镜检下列情况：运动细胞；细胞内污染；细胞病理学。如镜检确定细胞培养物中具有污染原生动物的迹象，则立刻作原生动物污染检测试验。

② 取待测单层细胞一瓶(悬浮细胞1000r/min离心10分钟)，吸上清液到无菌的15ml离心管中，室温放置作其他检测用。

③ 用5ml无钙、镁的Hank's液洗涤细胞，弃洗涤液。按常法用胰酶消化制备细胞悬液。

④ 待检细胞悬液接种原生动物培养基：

A) 分别接种0.5ml细胞悬液到双相血琼脂培养基、Pyb培养基、BHI血琼脂培养基、Leishmania培养液中。

B) 固体培养基用微生物接种环划线，于35℃培养7～10天，用显微镜检查有无鞭毛虫，胞囊及原生动物的滋养体。

C) 用收集的单层细胞上清液(悬浮细胞自然沉淀片刻、直接取上清液)做湿片，每份做5片，于相差显微镜下检查原生动物的存在。

⑤ 吉姆沙(Giemsa)染色：

A) 无菌条件下加适宜的培养基1.5ml到每支放有小盖玻片的无菌Leighton管中，接细胞悬液(0.2ml/支)，于37℃培养至细胞形成单层。

B) 从管中取出盖玻片，用甲醇固定10分钟，空气干燥。

C) Giemsa染色10分钟，用自来水冲洗，将盖玻片移到标准载片上，封片。

D) 用显微镜低倍、高倍物镜观察，仔细检查有无原生动物的存在。

这里推荐的 ATCC 细胞培养物中原生动物污染检测方法适合于大部分普通原生动物(limaxamoebae)的检测。这些原生动物能与培养中的细胞共存。由于胞囊和滋养体(原虫)上损坏的组织细胞很相似,所以它们偶尔污染会注意不到。另一方面,当培养细胞大量污染了阿米巴后,常变成颗粒状,并逐渐完全解体,所耗时间根据接种物的大小以及胞囊或活动营养体在接种物中是否占优势而定。对于初次作原生动物污染检测,对原生动物的形态了解不多的研究者,务必考虑作阳性对照。*Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010)、*Naegleria lovaniensis* (ATCC 30569)、*Entamoeba histolytica* (ATCC 30042)和 *E. invadens* (ATCC 30020)均是很好的标准阳性对照物。

第9章　细胞培养物冻存前后的特殊检测

连续传代培养的任何一种动物细胞都存在被其他种、系细胞交叉污染的潜在危险，尤其是经常以两种以上的细胞系作为研究材料的实验室，交叉污染是难以避免的。Nolso－Ress 等在早期的研究中，检测了来自 62 个实验室的 446 株细胞系，发现 74 株细胞存在不同程度的交叉污染，其中 32 株混杂了两种以上的细胞系，2 株已是面目全非，无法鉴别。后来，Hukku 等也报道，在所检测的 275 株动物细胞系中，96 株显示种内、种间的交叉污染。在动物细胞培养、保存过程中，细胞的交叉污染问题不可忽视。选用适宜的方法定期检测专业实验室使用的细胞系质量，已迫在眉睫。目前，国内、外鉴别动物细胞交叉污染的方法有免疫学试验、同工酶分析和细胞遗传学方法。三种方法的配合应用，可以准确地检测动物细胞种内、种间的交叉污染。

§9.1　免疫荧光抗体染色方法

间接免疫荧光抗体染色技术是一种经典的免疫学实验技术，已广泛用于动物细胞系的种系鉴定与交叉污染检测。该技术分两步进行。第一步，用兔子抗血清标记待检细胞和阳性、阴性对照细胞。第二步，加荧光染料(FITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白抗体，经保温一定时间后，荧光标记的抗体将结合到已标有兔抗体的靶细胞上，借助荧光显微镜即可观察靶细胞周围荧光抗原－抗体复合物。

一、抗血清的制备

(1) 用常规方法收集已知种属的细胞培养物，用 Hank's 平衡盐溶液洗涤 3 次，最后一次离心的沉集细胞用适量 Hank's 液

悬浮。

(2) 调整活细胞浓度为每毫升 5×10^5 个、1×10^6 个和 1×10^7 个。第一周、第二周和第三周，免疫兔子分别采用 5×10^5 个/ml、1×10^6 个/ml和 1×10^7 个/ml 的细胞浓度。

(3) 免疫接种兔子时，耳静脉各注射 1ml 细胞悬液，每周两次，共 3 周。以后每周加强注射一次，以 10^7 活细胞/ml 注射为宜。

(4) 最后一次加强注射后，取血检测效价。效价达 1:8 以上，则可心脏采血，分离血清，于 56℃ 加热灭活，小量(0.2ml)分装，贮于 -70℃ 备用。

二、动物细胞系的种属鉴别

(1) 采用常法收集待检细胞培养物，用 PBS(pH7.5)液洗涤 3 次，离心，沉集细胞用 PBS 悬浮，调整细胞浓度为 $3\times10^6\sim4\times10^6$ 个/ml。

(2) 取 0.1ml 细胞悬液同 0.1ml 经过适当稀释的兔抗血清混匀，置湿的培养盘中，室温放置 30 分钟。用 PBS 液洗 3 次除去残余抗体，避光加 0.1ml FITC-山羊抗兔抗血清，于暗处作用 30 分钟。

(3) 作用后的细胞用 PBS 液洗 3 次，移取少量的细胞悬液滴在载玻片上，用荧光显微镜检查染色情况。细胞周边产生荧光环的样品即为阳性反应(图 9-1)。

此法用于动物细胞的种属鉴别和交叉污染，具有简便和灵敏的优点，在适当的分辨条件下，可以检测出 1/10000 的污染细胞。

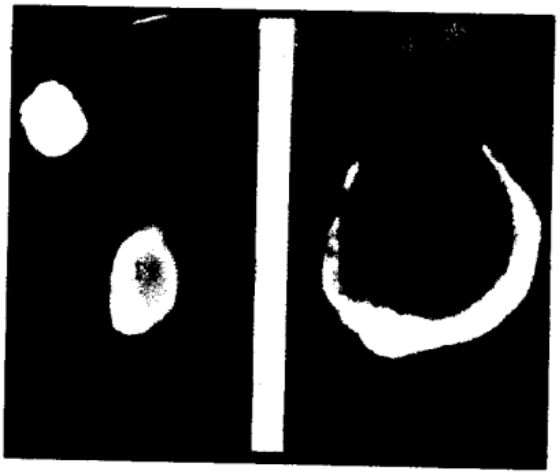


图 9-1 细胞周边的荧光光晕为典型的阳性反应

§9.2 同工酶电泳图谱分析法

通过对25个不同种属的细胞系抽提物进行同工酶电泳图谱分析结果表明，同工酶可用于动物细胞种属鉴定和细胞种间交叉污染检测。尽管动物细胞内存在多种同工酶，但只要确定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PD）、乳酸脱氢酶（LDH）和核苷磷酸化酶（NP）的电泳迁移率，就可以鉴定动物细胞系的种属来源。这种方法具有高度可靠性，重复性好，且经济实用，适合于基层实验室和一般临床医院选用。

一、待检细胞抽提物的制备

（一）方法一

（1）用常法收集待检细胞培养物，用0.9%NaCl-EDTA液（含0.6×10^{-4}mol/L EDTA，pH7.1）洗涤3次，离心，将沉集细胞悬浮于NaCl-EDTA液中，调整细胞浓度为每毫升$2\times10^7\sim5\times10^7$个。

（2）将细胞悬液置液氮或干冰-乙醇冰浴中迅速冻融3次，用超声波处理使细胞破碎；也可用等体积的辛醇混合，于4℃放置过夜。

（3）将破碎细胞匀浆移至微型离心管中，高速离心1～2分钟，上清液分装后贮于-70℃备用。

（二）方法二

（1）用常法收集待检细胞培养物，用无钙、镁的磷酸缓冲液洗涤3次，将沉集细胞悬浮于15ml离心管中，调整细胞浓度为每毫升2×10^7个，离心。

（2）弃上清液，加入50～100μl的细胞破碎液（1∶5Triton×100 NaCl-EDTA液，贮于4℃）悬浮沉集细胞，充分混匀，置室温片刻。

（3）转移细胞抽提物到微型离心管中，用巴斯德吸管反复吹吸，直到细胞完全溶解，溶液呈雾状。

(4) 高速离心 2 分钟，弃沉淀，上清液贮于 -70℃ 备用。

二、待测细胞抽提物的淀粉凝胶电泳

(一) 淀粉凝胶的制备

(1) 称取 60g 电泳淀粉加到 500ml 凝胶缓冲液中，加热搅拌到 90℃，使其充分溶解，置于真空 1 分钟左右以除去气泡，并冷却到 60℃。

(2) 于 LDH 和 G6PD 淀粉胶中加适量的 NADP(表 9-1)，小心混匀。

表 9-1　　LDH、G6PD、NP 三种同工酶电泳试剂

酶系统	LDH	G6PD	NP
电泳缓冲液	TC	TEB	TEB
制胶缓冲液	TC(0.1×)	TEB(0.1×)	TEB(0.2×)
染色液	10ml 双蒸水	5ml 双蒸水	20ml 双蒸水
	5ml 0.5mol Tris pH7.5	5ml 0.025mol 葡萄糖-6-磷酸	5ml 0.1mol $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
	5ml 1.0mol 乳酸钠	5ml 0.5mol Tris pH7.5	50ml 肌苷
	5ml NAD (10mg/ml)	5ml 0.1mol $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	100μl 黄嘌呤氧化酶
	5mg MTT	5ml 0.005mol NADP	5mg MTT
	2mg PMS	5mg MS	2mg PMS
		2mg PMS	

(3) 用常法制凝胶板，室温中静置冷却 2～3 小时。

(二) 淀粉凝胶电泳

普通垂直凝胶电泳装置即可用于此实验。

(1) 溶解细胞抽提物，高速离心 1～2 分钟，使细胞碎片沉淀。

(2) 移去凝胶上的梳子，用微量进样器加 30～40μl 细胞抽提液到加样孔中。移去胶槽固定器，凡士林封胶。

(3) 加入适量的电泳缓冲液(表 9-2)到电泳槽中，固定淀粉胶板。

(4) 于 4℃ 条件下电泳 16～18 小时，电压为 4～5V/cm。

(三) 同工酶显色

(1) 电泳完毕，取出淀粉胶，水平分成三等份，放入棕色盒内。

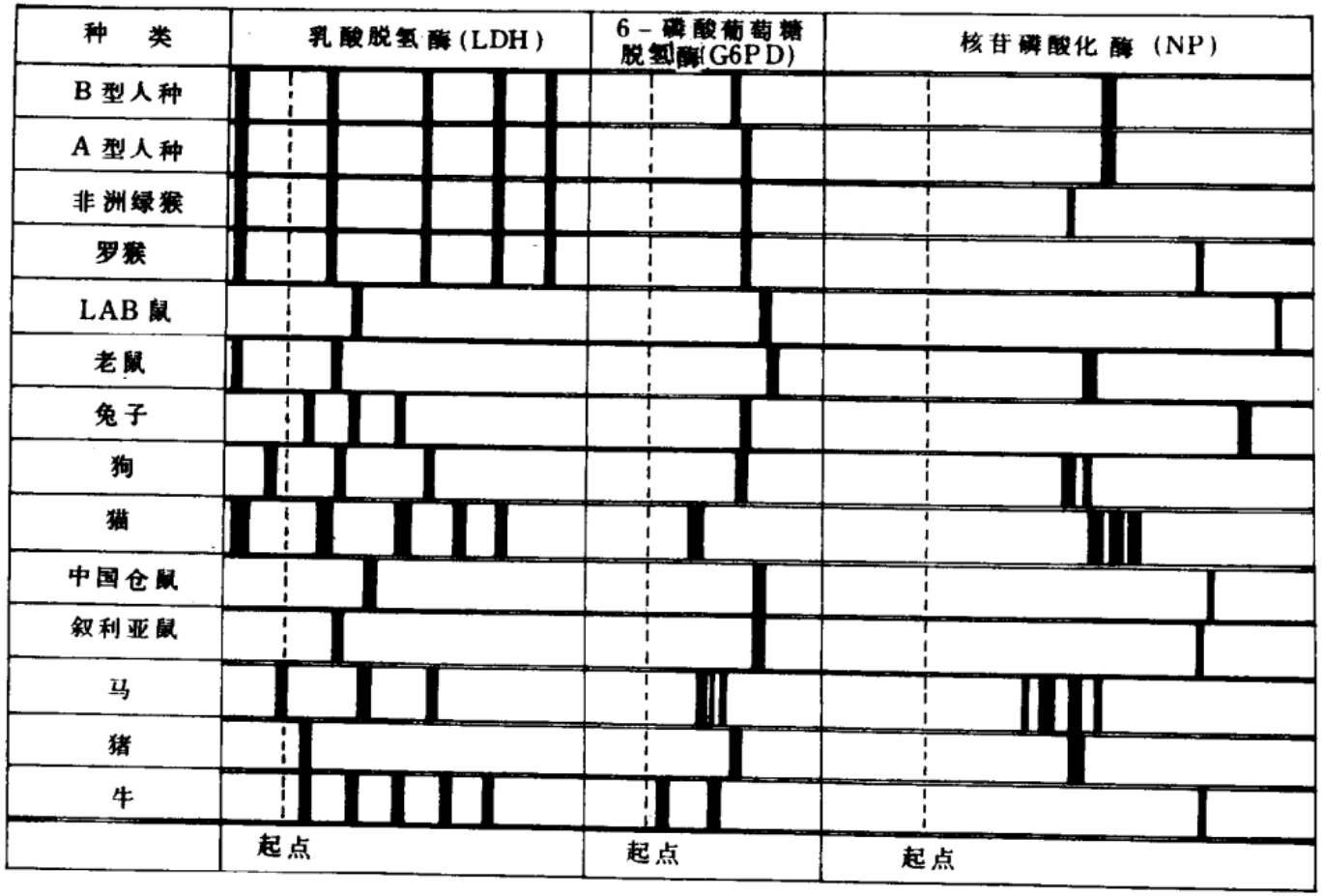


图 9－2　LDH、G6PD 和 NP 同工酶图谱

(2) 加入染色液到染色盒中,使其浸泡胶块,于37℃避光显色1～3h(显色时间的长短视酶的活性而定)。

(3) 观察色带,比较细胞抽提物中各种同工酶的迁移率,从而确定待测细胞系的种属关系。

同工酶谱(图9－2)是3种同工酶的标准迁移率。该图谱可以用来查对不同种属来源细胞系的同工酶,图中标明了一些常见种属细胞系的标准带型。

表9－2　　淀粉电泳缓冲液贮存液

Tris－柠檬酸盐(TC)	1×贮存液
Tris	17g
柠檬酸·H_2O	9.1g
双蒸水	1000ml
pH	7.1
Tris－EDTA－硼酸盐(TEB)	**5×贮存液**
Tris	109.0g
EDTA－Na_2	7.6g
硼酸	6.2g
双蒸水	1000ml
pH	8.6

三、待检细胞抽提物的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳用于动物细胞同工酶分析可获得令人满意的结果,其电泳分带原理、操作步骤与蛋白质电泳相似,可参考酶学方法手册。近几年,美国corning公司已推出"Authentikit™系统"产品用于同工酶分析。该系统包括成形凝胶、显色试剂、标准细胞抽提物、对照细胞抽提物等试剂,具有使用方便、操作简单,检测结果重复性好的特点。试剂盒附有详细的使用说明书,使用者阅读即可操作。应用琼脂糖凝胶电泳作动物细胞交叉污染检测,问题的关键不在电泳过程,而取决于研究者对各种同工酶图谱的认识和分析。为此,特列出一些动物种属细胞内存在的7种同工酶的电泳迁移距离和迁移率(表9－3),供研究者比较分析。

表 9-3　一些常见动物种属的 7 种同工酶迁移率

种　名	核苷磷酸化酶		葡萄糖-6-磷酸脱氢酶		苹果酸脱氢酶	
	迁移距离	迁移率	迁移距离	迁移率	迁移距离	迁移率
标准品	24.6	1.00	18.1	1.00	12.0	1.00
对照品	12.8	0.52	14.5	0.80	8.2	0.68
羱羊(Aoudad)	17.2	0.70	10.4	0.58	12.1	1.01
狒狒(Baboon)	18.8	0.75	15.7	0.91	10.4	0.87
蝙蝠(Bat)	19.7	0.79	8.9	0.49	5.6	0.47
牛(Bovine)	23.1	0.94	9.7	0.54	13.0	1.08
水牛(Buffalo)	19.7	0.80	9.6	0.53	16.5	1.38
猫(Cat)	16.4	0.64	9.5	0.53	12.4	1.03
狗(Dog)	10.6	0.42	13.0	0.72	11.2	0.93
狐狸(Fox)	11.4	0.46	13.9	0.77	12.1	1.01
豚鼠(Guinea pig)	18.7	0.75	18.5	1.02	10.4	0.87
中国仓鼠(Hamster, Chinese)	23.0	0.94	16.9	0.93	13.2	1.10
叙利亚鼠(Hamster,Syrian)	21.4	0.87	17.5	0.97	11.6	0.97
马(Horse)	12.4	0.50	–	–	–	–
A种人(Human A)	12.9	0.52	14.5	0.80	8.3	0.69
B种人(Human B)	12.8	0.5	12.1	0.67	8.3	0.69
水貂(Mink)	20.0	0.81	13.5	0.74	12.9	1.08
猴(Monkey)	11.3	0.46	15.0	0.83	8.6	0.72
绒猴(Monkey, Rhesus)	20.0	0.81	15.0	0.83	8.6	0.72
小鼠(Mouse)	25.2	1.02	18.1	1.00	12.0	1.00
兔(Rabbit)	25.1	1.01	12.3	0.68	9.9	0.83
浣熊(Raccoon)	17.5	0.71	10.4	0.58	13.9	1.16
大鼠(Rat)	11.5	0.46	18.7	1.03	12.2	1.02

续表

种　名	甘露糖－6－磷酸异构酶		B 肽 酶	
	迁移距离	迁移率	迁移距离	迁移率
标准品	15.5	1.00	7.2	1.00
对照品	12.4	0.80	11.4	1.58
鬣　羊(Aoudad)	11.0	0.71	28.3	3.93
狒　狒(Baboon)	12.5	0.81	15.9	2.21
蝙　蝠(Bat)	12.8	0.83	11.3	1.57
牛(Bovine)	9.0	0.58	18.0	2.5
水　牛(Buffalo)	–	–	–	–
猫(Cat)	13.5	0.87	20.1	2.79
狗(Dog)	9.4	0.61	16.1	2.24
狐　狸(Fox)	6.7	0.43	18.0	2.5
豚　鼠(Guinea pig)	11.6	0.75	17.8	2.47
中国仓鼠(Hamster, Chinese)	13.7	0.88	26.1	3.63
叙利亚鼠(Hamster, Syrian)	10.9	0.70	16.5	2.29
马(Horse)	–	–	27.9	3.88
A 种人(Human A)	12.9	0.83	12.4	1.72
B 种人(Human B)	12.9	0.83	12.4	1.72
水　貂(Mink)	10.4	0.67	18.5	2.57
猴(Monkey)	12.6	0.81	12.4	1.72
绒　猴(Monkey, Rhesus)	13.7	0.88	–	–
小　鼠(Mouse)	16.8	1.08	8.0	1.11
兔(Rabbit)	14.3	0.92	4.7	0.65
浣　熊(Raccoon)	–	–	–	–
大　鼠(Rat)	9.8	0.63	16.2	2.25

续表

种　名	天冬氨酸转氨酶		乳酸脱氢酶				
	迁移距离	迁移率	迁移距离				
标准品	10.0	1.00	7.1	12.0	15.7		
对照品	15.0	1.50	−5.6	2.8	10.6	18.5	24.8
鬣羊(Aoudad)	10.3	1.03	0.7	4.9	9.2	13.9	18.9
狒狒(Baboon)	13.7	1.37	−5.6	2.8	10.6	18.0	26.3
蝙蝠(Bat)	10.0	1.00	−7.0	−1.1	5.3	12.0	16.1
牛(Bovine)	9.1	0.91	1.2	6.0	10.6	15.8	21.3
水牛(Buffalo)	10.2	1.02	−	3.0	8.2	12.6	17.4
猫(Cat)	10.5	1.05	−4.3	2.0	7.8	13.8	20.1
狗(Dog)	10.2	1.02	−4.4	3.8	11.1	18.1	21.9
狐狸(Fox)	9.4	0.94	−1.5	6.3	13.5	−	−
豚鼠(Guinea pig)	12.0	1.20	−0.7	6.5	13.4	20.7	−
中国仓鼠(Hamster, Chinese)	11.8	1.18	6.1	−	−	−	−
叙利亚鼠(Hamster, Syrian)	12.4	1.24	4.7	−	−	−	−
马(Horse)	12.1	1.21	−0.9	5.9	12.4	18.9	28.1
A种人(Human A)	15.0	1.50	−5.6	2.8	10.6	18.5	24.8
B种人(Human B)	15.0	1.50	−5.0	3.0	10.6	18.7	26.9
水貂(Mink)	8.8	0.88	0.2	7.0	13.6	21.0	
猴(Monkey)	12.6	1.26	−5.2	2.9	10.2	18.3	24.9
绒猴(Monkey, Rhesus)	12.7	1.27	−5.5	3.0	11.6	20.8	28.7
小鼠(Mouse)	10.0	1.00	5.5	9.7	12.8	−	−
兔(Rabbit)	14.6	1.46	0.2	5.5	10.7	16.7	−
浣熊(Raccoon)	13.4	1.34	−0.4	7.0	13.5	20.5	−
大鼠(Rat)	10.2	1.02	−4.9	3.0	10.9	16.6	−

§9.3 同工酶分析在种内细胞交叉污染检测中的应用

随着动物细胞建系数量的剧增，同种细胞系间的交叉污染也日趋增多。特别是对那些研究工作中涉及许多人或小鼠杂交瘤的实验室，这一问题就显得尤为突出。检测细胞多形性同工酶对观察一特定种属中不同个体的细胞交叉污染来说是十分重要的。

前面已经介绍了利用 G6PD、LDH 和 NP 同工酶的电泳迁移率所表现的差异，来鉴别细胞系所属种属和检测种内细胞系的交叉污染。然而，对于同种异体细胞系交叉污染的检测，则要通过各种多形性同工酶的分析，才能达到预期效果。细胞遗传学研究分析表明，在同种不同个体的细胞系中，某些特定的酶常常有不同的共显性等位基因，其产物是多形性的，通过电泳分离分析，可清楚地分辨出个体间的这些细小差异。一般情况下，这些多形性同工酶的表型极稳定。因此，在特定的位点范围内确定了这种同种异体同工酶的表型，就可以用它们为每一待测细胞系提供一个同种异体同工酶的遗传特征。在人的细胞系中，7 种(或更多)同种异体多形性同工酶表型已经足够提供一个高度可靠的细胞系鉴别依据。腺苷脱氨酶(ADA)、G6PD、脂酶 D(ESD)、肽酶 D (PED－D)、葡萄糖变位酶 1 和葡萄糖变位酶 3(PGM1，PGM3)、6－磷酸葡萄酸脱氨酶(PGD)被认为是 7 种常见的同种异体多形性同工酶，其表型图谱可通过电泳分离获得(图 9－3)。在确定同工酶的表型后，应用其表型和正常人群体的表型频率资料(表 9－4)，可推算出某一特定细胞系遗传特征出现的频率，如一个来源于白种男性的细胞系，带有 ADA－1、G6PD－B、ESD－1、PEP－D－1、PGM1－2、PGM3－1、PGD－A 的遗传特征，其表型频率查表 9－5 为：$0.8845 \times 1.0 \times 0.8131 \times 0.9780 \times 0.0558 \times 0.5403 \times 0.9536 = 0.0202$。如这一白人男性细胞系在实验室长期传代，检测 7 种多形性同工酶时，电泳表型图谱差异很大，出现ADA－2、G6PD－

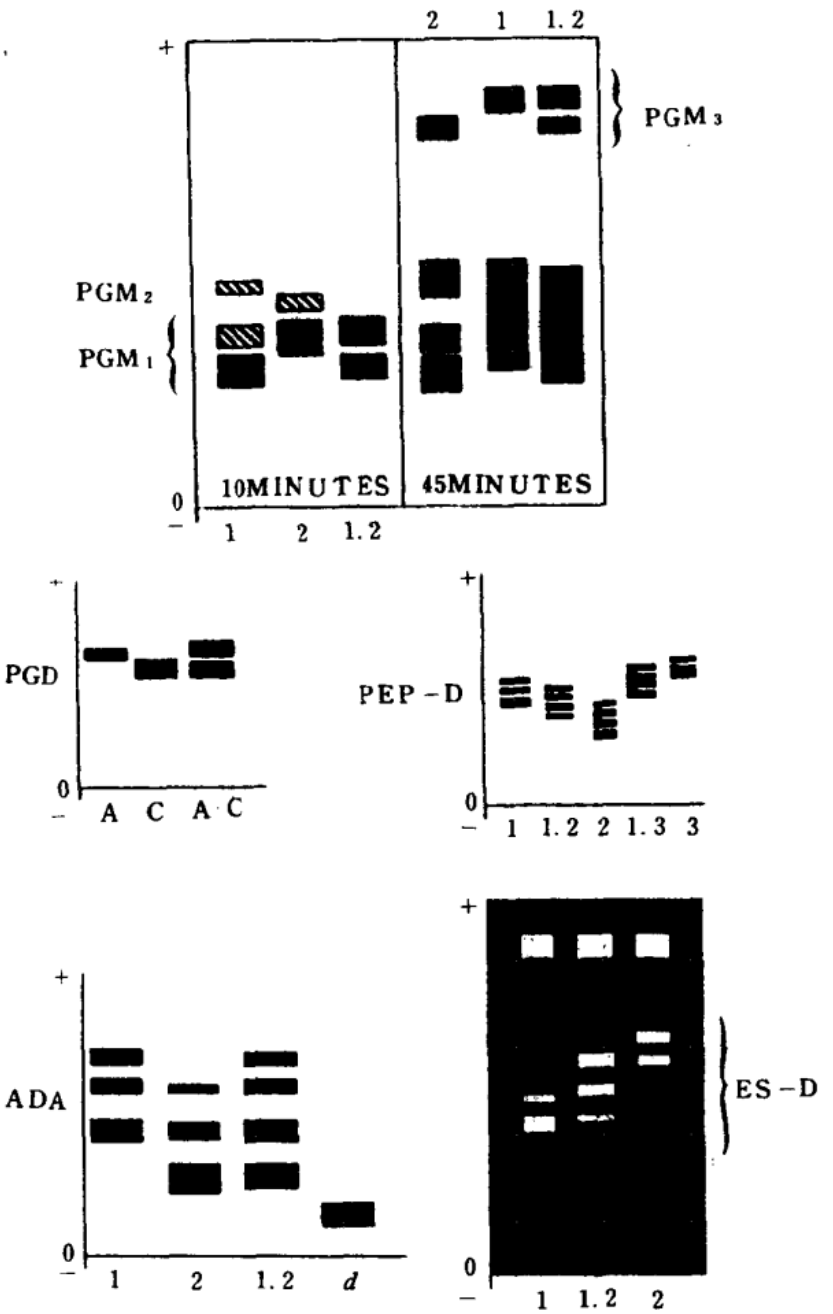


图 9-3 人体细胞系的 6 种多形性同工酶表型图谱

B、ESD-2、PEP-D-1-2、PGM1-1、PGM3-2、PGD-C 的表形图谱，可初步认为存在同种异型细胞系的污染。进一步查表为：

$0.0017\times1\times0.0092\times0.0220\times0.5849\times0.0600\times0.0009=1.08$

$\times 10^{-11}$。显然，1.08×10^{-11}与0.0202相差甚远，证明白人男性细胞系被交叉污染。可见0.0202这个数值是非常有用的，它反应了具有这种特殊遗传性状的细胞系的概率。

表9-4　白人和黑人群体中7种多形性同工酶的表型频率

酶　类	表　型	白人表型频率	黑人表型频率
ADA	1	0.8845	0.9320
	1-2	0.1138	0.0668
	2	0.0017	0.0012
G6PD	A	0	0.4400
	B	1	0.5600
ESD	1	0.8131	0.8039
	1-2	0.1776	0.1961
	2	0.0092	0.0096
PEP-D	1	0.9780	0.9110
	1-2	0.0220	0.0479
	1-3	0.0000	0.0411
	2	0.0001	0.0006
	3	0.0000	0.0005
PGM1	1	0.5849	0.6019
	1-2	0.3565	0.3204
	2	0.0558	0.0485
PGM2	1	0.5403	0.4085
	1-2	0.3997	0.4085
	2	0.0600	0.4553
PGD	A	0.9536	0.9264
	AC	0.0455	0.0727
	C	0.0009	0.00009

小鼠细胞系和杂交瘤中同工酶的多形性已有描述，检测种内细胞交叉污染涉及的酶类有：酯酶(ES-1，ES-2)，二肽酶(DiP-1)，谷草转氨酶(GOT-2)，异柠檬酸脱氢酶(NADP依赖型)，NADP-苹果酸酶(MOD-1)，葡萄糖-磷酸异构酶(GPI-1)，磷

酸葡萄糖变位酶(PGM1.2)。这些同种异体多形性同工酶的电泳分离方法已建立,但还没有充分应用到实际工作中。

§9.4 染色体分析方法

核型分析技术用于细胞系的种内和种间交叉污染的检测已有相当长的历史。多数情况下,尽管不同种细胞染色体数量、结构相差很大,但用显微镜观察就足以鉴别。而亲缘关系相当接近的灵长类细胞系之间或人癌细胞系之间的微小差别的比较,则需采用各种染色体显带技术加以评估。

目前,实验室常用染色体分析方法鉴定细胞系或检测细胞交叉污染,这种方法具有细胞遗传学的坚实基础,所以广泛被采用。染色体分析包括四种基本的染色体显带技术,即 G 带、Q 带、C 带和 R 带。四种显带技术的综合应用,可分析细胞染色体的精细结构。然而,在动物细胞低温保存的质量控制中,尤其是检测细胞的交叉污染,应用最多的是 G 带分析。所以,这节中主要介绍染色体 G 带分析技术的程序及分析方法。

一、试剂

(1) 乙酰甲基秋水仙碱(Colcemid):将 1mg 的乙酰甲基秋水仙碱溶于 50ml 双蒸水中,过滤除菌,分装 2ml 瓶,冻存于 -20℃。

(2) 低渗液:0.56gKCl 溶于 100ml 双蒸水中,灭菌,贮于 4℃冰箱。

(3) 2×SSC 液:0.6mol/L NaCl 液与 0.06mol/L 柠檬酸钠液等量混合,灭菌,贮于 4℃冰箱。

(4) 饱和 $Ba(OH)_2$ 液:加过量的 $Ba(OH)_2$ 固体到适量的双蒸水中,使其饱和,使用时取溶液上部的清亮部分。

(5) 固定液:3 份无水甲醇与 1 份冰醋酸混合,保持在冰浴中,使用前制备。

(6) 胰酶 - EDTA 液:

EDTA - Na_2	0.2g	葡萄糖	1.0g

KCl	0.2g	NaCl	2.0g
KH_2PO_4	0.2g	酚红(0.3%)	3.0ml
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.18g	胰酶(Difco, 1:250)	0.1g
双蒸水	100ml		

用1mol/L HCl或1mol/L NaOH调节pH到7.4,过滤除菌,分装,贮于-20℃以下。

(7) 吉姆萨(Giemsa)染色缓冲液(G-缓冲液):将KH_2PO_4 3.4g溶于双蒸水100ml,用50%NaOH调节pH6.8,121℃灭菌,贮于4℃。

(8) 吉姆萨(Giemsa)染液:将Giemsa 1.0g、甘油66ml、甲醇(100%)66ml放置过夜,使其充分溶解,于4℃贮存1个月后使用。

(9) Q带染色缓冲液(Q-缓冲液):0.2mol/L Na_2HPO_4 27.8ml和0.1mol/L柠檬酸22.2ml充分混合,用1mol/L NaOH或1mol/L HCl调pH5.5,灭菌,贮于4℃。

(10) 奎尼染液:溶解1.0g奎尼芥(Quinacrine mustarcl,QM)在100ml双蒸水中,过滤除菌。

(11) 胰酶液:制备1%无菌胰酶液,分装,贮于-20℃以下。

二、操作步骤

(一) 染色体铺片

制备染色体铺片的标准方法包括中期细胞的低渗膨胀、固定、玻片铺展、染色、封片、镜检。

(1) 取对数生长期细胞一瓶(T-75瓶,表面积75cm^2),加入试剂(1),使其最终浓度为0.05~0.1μg/ml。

(2) 37℃培养1~4小时,培养时间的选择取决于所研究细胞系的生长周期。例如,人的二倍体细胞系培养2~4小时,而中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)则仅培养45~90分钟即可。

(3) 用常规胰酶消化法制备悬浮细胞(如悬浮细胞培养则省去消化步骤),离心收集细胞。

(4) 将细胞悬浮于KCl低渗液中,37℃培养10分钟,1000r/min离心10分钟,沉集细胞用少量KCl(沉集细胞的1~2倍)低

渗液重新悬浮。

(5) 用毛细管缓缓加入 3～4ml 新鲜制备的固定液，充分混匀，放置 15 分钟，离心，弃上清液，加入 4～5ml 固定液，充分混匀，于室温放置 15 分钟。

(6) 重复(5)步骤，离心 6 分钟，移去多余的上清液，留沉集细胞 10～15 倍体积的上清液悬浮细胞。

(7) 滴加细胞悬液于洁净的玻片上(将玻片于 4℃ 预冷，并呈 20°倾角)，轻吹滴液，使细胞悬液均匀铺展到玻片上。将玻片置于 40%～50%湿度的室温下空气干燥。

(8) 将玻片置于相差显微镜下，观察中期细胞染色体展开情况。如细胞密度过大，可调节细胞浓度，使其达到最佳密度，便于染色体计数。

(9) 用 1%吉姆萨染色 20 分钟，用自来水冲洗，于空气中干燥，作核型分析。

(二) 吉姆萨显带技术(G 带)

(1) 将空气干燥的玻片(按步骤(一)方法制备后 2～7 天内使用)放于 60℃ 保温 3～5 分钟，加 G－缓冲液后继续保温 11 分钟。

(2) 将玻片沥干，加 0.95ml胰酶－吉姆萨染液铺盖玻片，于 4℃ 放置 15 分钟。

(3) 用双蒸水冲洗，空气干燥，用显微镜油镜观察染色体带型。有经验的细胞遗传学家能通过这一染色体分型技术，用普通光学显玻镜观察染色体的倒位、缺失、易位。选择染色体带型照相(图 9－4)。

图 9－4 CHO 细胞 G－带显色

(三) 奎带技术(Q－Banding)

(1) 将铺片浸泡于 40mlQM 液中，于室温染色 30～60 分钟。

(2) 用自来水冲去铺片上染液,双蒸水漂洗 3～5 分钟,于 Q－缓冲液中浸泡片刻,放一片洁净的盖片于加少许 Q－缓冲液的铺片上进行封片,用吸水低吸去过量的水分。

(3) 用荧光显微镜观察。

(四) C 带显带(C－banding)

(1) 将铺片浸泡于 0.2mol/LHCl,于室温放置 1 小时,用自来水冲洗,双蒸水漂洗 3～5 分钟,用 C－缓冲液浸泡片刻。

(2) 将铺片浸泡于饱和 $Ba(OH)_2$,于室温放置 1 小时,用双蒸水漂洗(至少换水 5 次)。

(3) 将铺片浸泡于 2×SSC 液中,于 58～60℃保温 1 小时。

(4) 铺片换 2%～3% 吉姆萨工作液染色 30 分钟,如染色太浅,重复染色 1 次。用双蒸水漂洗,空气干燥。

(5) 将干燥的载片用显微镜油浸物镜观察,作显微照相。

§9.5 DNA 指纹图谱分析方法

重组 DNA 技术的进展使得 DNA 探针直接分析人体细胞系低温保存中交叉污染成为可能。由重复基因组成的 DNA 序列在许多特定区域都具有高频率的可杂交单位,用限制性内切酶特异性地切开 DNA 分子,通过 Southern 印迹杂交技术测定杂交结果。限制性内切酶酶切片断的大小,数量构成的 DNA 指纹可用于细胞系的鉴定和分型。由于这种 DNA 指纹技术具有对人体不同细胞系的分辨能力,所以能有效地用于细胞系交叉污染的检测。细胞系交叉污染检测采用 VNTR 分析,即从人的细胞系培养物中抽提高质量的 DNA,用 Hinf Ⅰ或 Hae Ⅲ限制内切酶消化,琼脂糖凝胶电泳分离消化片断,然后使 DNA 片断变性并转移到尼龙膜上与 ^{32}P 标记的单位点探针 pYNH24 杂交,随后,在非常严格的条件下洗涤,X－光胶片显影,观察重复序列的多态性,即 DNA 指纹图谱。其特异性的带型,可精确地比较人体细胞的 DNA 指纹差异。

一、细胞培养物 DNA 的抽提

（一）试剂

（1）PBS 缓冲液。

（2）细胞裂解液（TEN）：10mmol/L Tris－HCl，pH7.4，0.5mol/L NaCl，1mmol/L EDTA。

（3）10%NP－40。

（4）NLB 液：10mmol/L Tris－HCl，pH9.0，0.4mol/LNaCl，2mmol/L EDTA，0.66%SDS。

（5）蛋白酶 K：25mg/ml，分装贮于－20℃。

（6）TE 缓冲液：10mmol/L Tris－HCl，pH7.4，0.1mmol/L EDTA。

（二）操作步骤

（1）选择待检细胞培养物，用常法收集细胞，PBS 液洗涤 2 次，调整细胞浓度为每毫升 10^6～10^7 个，置于冰浴进行 DNA 抽提（如暂不抽提 DNA，将细胞贮于－70℃备用）。

（2）加入适当体积的试剂(2)液到细胞沉集物中，通常 2×10^7 个细胞加 4ml 试剂(2)，同时加入试剂(3)，使其终浓度为 0.65%，反应管放于冰浴中缓缓摇动 2 分钟。

（3）1500×g、4℃离心 10 分钟。

（4）弃上清，加入约 3ml 的试剂(4)，轻轻摇动反应管，使沉淀充分悬浮。

（5）加入 0.06ml 蛋白酶 K[试剂(5)]，充分混匀，37℃摇动培养过夜，使核酸沉淀完全溶解。

（6）加约 1ml6mol/L NaCl 到完全溶解的核酸中，摇动 15 秒．于室温、1500×g 离心 15 分钟。

（7）吸取含有 DNA 的上清液到一个洁净的小离心管中，然后弃沉淀。

（8）加 2 倍体积的无水乙醇到上清液离心管中，转动管子使 DNA 沉淀，用细菌接种环收集 DNA，空气干燥 2 分钟。

（9）加 5ml 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀，空气干燥 2 分钟。

（10）转移 DNA 到含有试剂(6)试管中，4℃下缓缓摇动试管，

使 DNA 溶解，加入 RNAase 除去 RNA。用分光分度计测定 DNA 的浓度。

(11) 抽提 DNA 贮于 -20℃，防止反复冻融造成 DNA 失活。

二、DNA 纯度与浓度的测定

DNA 溶液的纯度与浓度可用紫外分光光度计来测定。纯 DNA 液的 A_{260}∶A_{280}的比值应为 1.8。比值低于 1.7 时，提示在 DNA 抽提时有大量的蛋白质和酚的污染，应进一步纯化。纯的双股 DNA(double - stranded DNA)液在 1cm 光程时，$1A_{260} = 50\mu g/ml$。此法可测定 DNA 的纯度，并计算 DNA 的浓度。

(一) DNA 浓度测定

(1) 取 5μlDNA 样品，加 995μl 无菌 TE 缓冲液，转移到 1cm 的紫外分光光度计比色杯中待测。

(2) 以 TE 缓冲液作空白对照，在紫外分光光度计 260nm 波长处读数，一般反复读数 10 次。

(3) DNA 样品的浓度以 μg/μl 计，读实际数值，按 $1A_{260} = 50\mu g/ml$ 计算抽提 DNA 浓度。

(二) DNA 纯度测定

(1) 记录 A_{260}测定数值，调节波长至 A_{280}，反复读数，记录 A_{280}的数值。

(2) 计算 A_{260}∶A_{280}的比值，评估抽提 DNA 样品的纯度。纯的 DNA 比值不低于 1.8。比值低于 1.7 应重新抽提。

三、限制性内切酶消化(Restriction Endonuclease Digestion)

限制性内切酶 MinfⅠ或 HaeⅢ能特异性地将 DNA 大分子切开，使其成为长度、大小不同的片断。片断经凝胶电泳分离，可用于制备 DNA 探针，进行 DNA 分子杂交研究。

(一) 试剂

(1) 纯的 DNA 样品。

(2) 限制性内切酶消化液(EBS)：将 15mmol 亚精胺(spermidine)和 1×酶缓冲液混合，然后加入 20uHinfⅠ或 HaeⅢ，充分混合备用。

（二）操作步骤

（1）加 4μg 的 DNA[试剂(1)]到每个 1.5ml 体积的硅化微量离心管中，补加无菌双蒸水，使其总体积为 22μl。

（2）加 8.0μl 试剂(2)到每个 DNA 样品管中，盖上管盖，轻轻地混匀，切勿激烈震动，否则 DNA 会破坏。

（3）DNA 样品管置于 37℃ 水浴中保温 4 小时，使 DNA 消化。

（4）制备琼脂糖凝胶，电泳分离消化 DNA 片断。

四、琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳可以很容易地将经限制性内切酶酶切的 DNA 片断(0.3－25kb)分离。分离大分子片断(800－12000bp)用低浓度琼脂糖(0.7%)，分离小分子片断(500－10000bp)用高浓度琼脂糖(1.0%)，300～5000bp 的片断则用 1.3% 的琼脂糖。根据分离样品量，分离速度和分辨率要求的不同，可选用不同规格的电泳槽，设定不同的电泳电压。

（一）试剂

（1）TAE 缓冲液：40mmol/L Tris，pH8.1，2mmol/L 醋酸，0.2mmol/L EDTA。

（2）1.0kb 的先导序列(Ladder)(BRL Cat. NO. 9NC110)。

（3）2.0μg/ml 溴化乙锭(EB)。

（4）琼脂糖(干粉)。

（5）10×载体缓冲液：20% Ficoll 400，0.1mol EDTA，pH8.0，1%SDS，0.25% 溴酚蓝。

（二）操作步骤

（1）用胶布将盛胶槽两端开口封住，胶槽为 20cm×20cm。

（2）用试剂(1)制备 1%(*W*/*V*)的琼脂糖凝胶。溶解琼脂糖采用微波炉加热煮沸，冷却到 60℃ 左右备用。

（3）将胶倒入盛胶槽中，放梳子，凝固 2 小时。

（4）去掉胶布和梳子，将盛胶槽放入电泳槽中，槽中加试剂(1)，淹没过胶约 0.5cm。

（5）加 5.0μl 的试剂(6)到待分离的 DNA 样品中，混匀。

(6) 小心地将 DNA 样品加到胶孔中，同时将试剂(2)加到相应孔中，便于确定样品 DNA 的分子量。

(7) 60V 恒压电泳过夜，溴酚蓝染料移动向胶的底部，小于 1kb 的 DNA 片断被分离。

(8) 电泳完毕，取出凝胶，用双蒸水漂洗，切除右上角的小块胶作为标记，置于 2μg/ml 的溴化乙锭染色液试剂(4)中染色 20min。

(9) 将凝胶置于 310nm 短波透射灯(transilluminator)下观察，标出酶切 DNA 片断的迁移位置，照相。

五、尼龙膜 Southern 转印

尼龙膜是一种极理想的 DNA 杂交转印膜，它具有耐用、结合稳定、有利于小分子 DNA 片断(200bp 以下)的结合及反复杂交等优点。此外，尼龙膜转印在碱性条件下进行，DNA 结合紧密，在不损失被检样品的情况下，可以反复冲洗去除多余探针而多次杂交。加之碱性条件转印 DNA 可以最大限度地减少条带扩散，使转印完全，条带清晰。

(一) 试剂

(1) 变性缓冲液：1.5mol/L NaCl，0.5mol/L NaOH。

(2) 中和液：1mol/L Tris－HCl，pH7.4，1.5mol/L NaCl。

(3) 0.5mol/L NaOH。

(4) 吸印纸。

(5) 尼龙膜。

(二) 操作步骤

(1) 取前法制备的凝胶浸泡于变性缓冲液的盘子中，室温摇动 30min，使 DNA 变性。

(2) 去变性液，加无离子水漂洗凝胶，换试剂(2)中和液摇动 30min，重复中和操作 2 次，弃中和液。

(3) 将胶倒扣在 3mm 滤纸上，将剪好的尼龙膜用 0.5mol/L 的 NaOH[试剂(3)]浸湿后铺在胶上。

(4) 尼龙膜上放几张干燥的 3mm 滤纸，再压上吸印纸，盖上

玻璃盘,加压 500g 左右的重物在盘上。

(5) DNA 转印过夜。

(6) 用镊子取出尼龙膜,用缓冲盐溶液(SSC)洗 2 次,倒扣在 3mm 的干燥滤纸上,用软质笔轻轻标出转印位置。

(7) 将尼龙膜置于 80℃真空干燥 2 小时。

六、尼龙膜杂交

(一) 试剂

(1) 0.1×SSC(NaCl,柠檬酸钠溶液)。

(2) 杂交缓冲液:0.5mol/L 的磷酸钠缓冲液,pH7.2,7% SDS,1mmol/LEDTA 和 1%的牛血清白蛋白(BSA)。

(3) 10mol/L NaOH。

(4) 2×SSC,0.1%SDS。0.1×SSC,0.1%SDS。

(5) 1×10^5cpm/ml ^{32}P 标记的 DNA 探针。

(二) 操作步骤

(1) 将转印尼龙膜置于试剂(1)中浸湿 10 分钟,然后转移到热封袋中。

(2) 用一支吸管挤压,使袋中的余液渗出。

(3) 加入 30ml 杂交缓冲液[试剂(2)]到每一个杂交袋中(0.125ml/cm^2),于 65℃保温 4~24 小时。

(4) 弃杂交液,并将余液压出袋外。

(5) 加试剂(3)使 DNA 探针变性(NaOH 的终浓度为 0.2mol/L)。

(6) 吸取试剂(5)(单位点探针,pYNH24,商品试剂)到 60℃预平衡的杂交缓冲液中,充分混匀,加入袋中。

(7) 补加约 30ml 杂交缓冲液(0.125ml/cm^2)到每个袋中,排气,封口,于 65℃保温 12~18 小时。

(8) 剪开袋的一角,将杂交液倒入放射性废液容器中,加试剂(4)液,稍微漂洗片刻,弃漂洗液于放射性废液容器中。

(9) 剪开袋口,取出尼龙膜,放入洗涤盘中,加试剂(4)于室温摇动漂洗 15 分钟。

(10) 加入60℃预平衡的试剂(4)漂洗液,重复漂洗2次,每次摇动漂洗15分钟。

七、放射自显影

放射自显影是通过X光胶片检测放射性标记物。X光胶片曝光时间的长短取决于所用放射性同位素的种类和含量。影像的分辨率高低则取决于射线类型和放射核素能量大小,高能量的β－^{32}P核素穿透能力强,会使胶片两侧较大范围感光,结果是信号较强,但影像较模糊,分辨率低。加用增感屏后可以提高检测灵敏度。另外,通过选用－70℃下进行曝光,使X光胶片的敏感性显著增强。

(一) 试剂

(1) 2×SSC液。

(2) 透明塑料膜。

(3) X光胶片。

(4) X光胶片盒。

(5) X光胶片冲洗液。

(6) X光胶片自动冲洗机。

(二) 操作步骤

(1) 取杂交尼龙膜于试剂(1)中,室温漂洗5分钟。

(2) 用镊子挟起尼龙膜,除去残余的漂洗液,展平,用塑料膜小心包裹,防止同位素污染胶片和胶片盒。

(3) 在暗室安全灯下,将尼龙膜夹在X胶片和增感屏之间,压入X胶片暗盒。

(4) 放置于－70℃5～10天,使其曝光。

(5) 取出胶片盒,恢复到室温,于暗室中取出胶片。如温度太低时取胶片,会产生静电而使胶片上出现云雾状或非特异性斑点。

(6) 按常规冲洗X胶片:显影1～5分钟,停影1分钟,定影5分钟,流水冲洗10分钟,自然干燥。

八、放射性标记DNA探针

用放射性同位素标记核酸作为探针,不仅可在基础研究中分

析基因的结构和功能，也可在临床上作为鉴定病原菌、遗传病和家族史的诊断工具。探针通过放射自显影，为杂交分析提供了高度的敏感性和较强的分辨力。采用新鲜的脱氧核苷三磷酸进行标记，可增强高度特异性。

（一）试剂

（1）10mmol 的 dATP、dGTP、dTTP。

（2）^{32}P 标记的 dCTP(111TBq/mmol)。

（3）Klenow 片断。

（4）Sephadex G－50 层析柱。

（二）操作步骤

（1）吸取 25ngDNA 加入一支硅化的微量离心管中，用双蒸水补足水分，使总体积达 9μl。

（2）95℃、10min 使 DNA 变性，冰浴冷却 2 分钟。

（3）加入 2μl 的试剂(1)、3μl 的反应液、10μl 试剂(2)和 3μl 的试剂(3)。

（4）混匀。

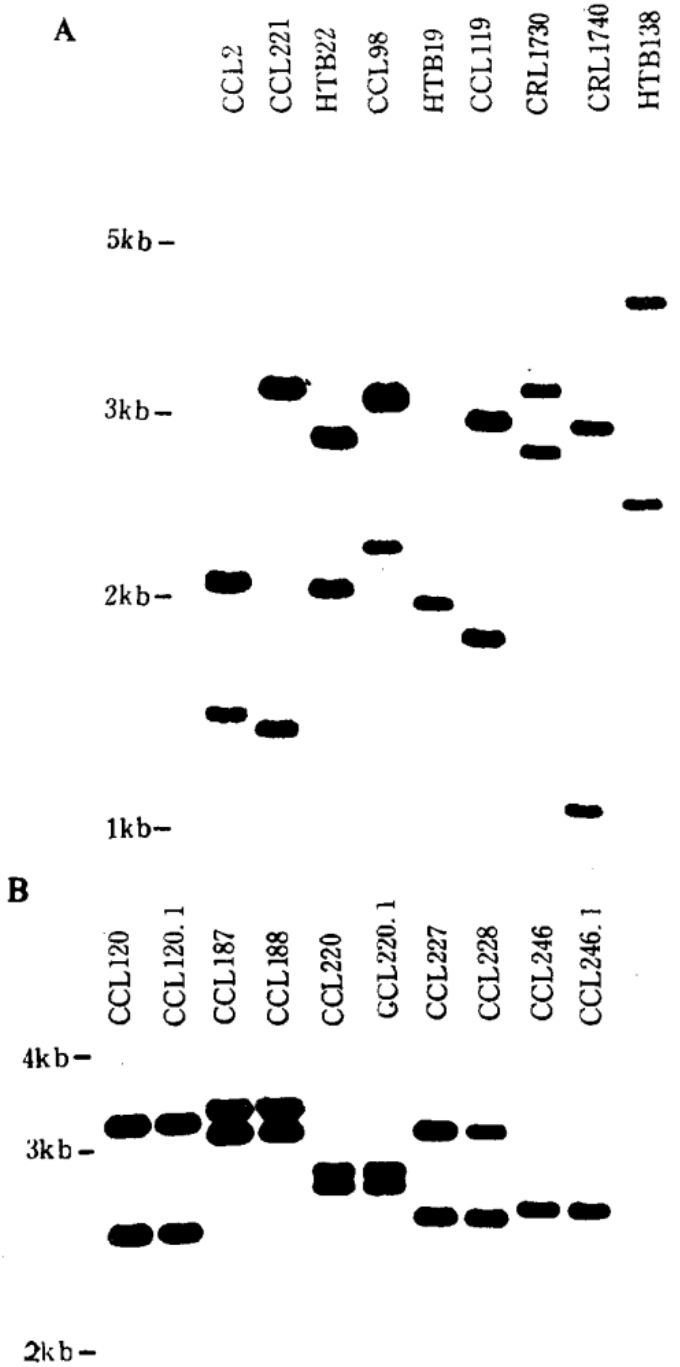
（5）于 37℃保温 1 小时。

（6）用试剂(4)纯化标记探针。

九、DNA 指纹图谱分析结果评估

单位点探针 pYNH24 的应用，使 DNA 指纹图谱分析更具有实用价值。该探针用于人类新细胞系的鉴定和不同个体细胞系交叉污染的检测都可获得令人满意的结果。ATCC 的检测结果证明：①单位点探针 pYNH24 可用于鉴定和识别人类同种异体的细胞系(图 9－5A)。在 120 个个体的研究中，形成探针杂合子的有 20 多种等位基因，这些基因的大小范围在 1.0～5.0kb 之间。②单位点探针 pYNH24 检测同一个体来源的不同克隆细胞系(或亚系)，无论是正常细胞系还是肿瘤细胞系，都存在相同的 DNA 指纹图谱(图 9－5B)。③单位点探针 pYNH24 在检测人类同种异体细胞系交叉污染时，检测频率很高，可达到 5%。ATCC 的研究者通过 ATCC CCL 119 细胞(白人女性急性淋巴白血病人细胞系)、

ATCC CCL 120 细胞(白人男性白血病人细胞系)混合杂交试验，验证了检测的灵敏性。他们首先将两株细胞系分别培养，然后以不同浓度的细胞比例混合，抽提各混合细胞的 DNA，进行杂交试验，获得使人信服的结果(图 9－5C)。



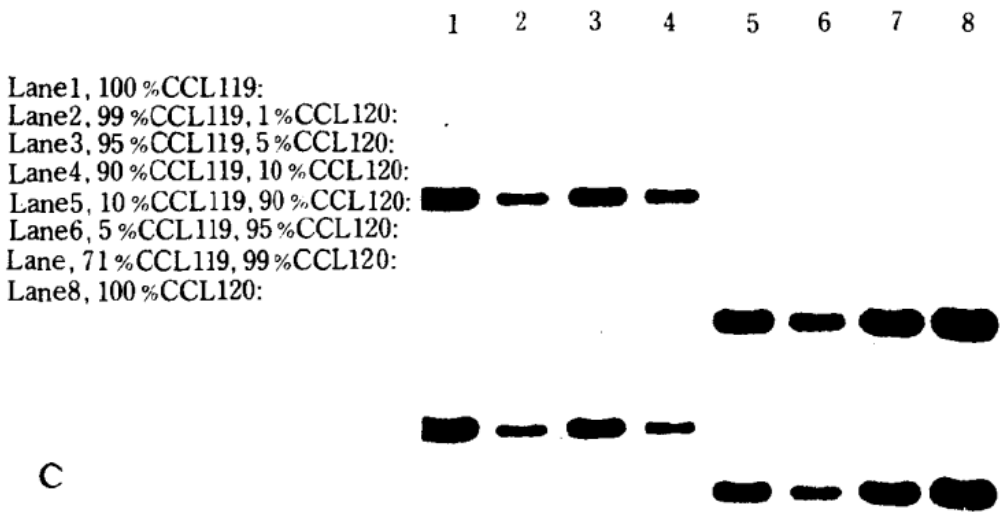


图 9－5　A、B、C 为人体细胞的限制性内切酶 HinfI 消化片断与 pYNH24 探针杂交的 DNA 自显影

A. 人体单一细胞 DNA 杂交自显影　B. 人体成双细胞 DNA 杂交自显影

C. 人体两株细胞(CCL119, CCL120)DNA 杂交自显影

§9.6　PCR 技术

Mullis 等(1985 年)首创的聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)是一种体外由引物介导的特异基因或克隆序列的酶促扩增技术。现已证明，它作为体外扩增 DNA 的新手段具有快速、简便、灵敏和特异性强等优点，在分子生物学、遗传学、临床医学诊断等领域中有广泛应用前景。近几年来，美国典型培养物收藏所(ATCC)和一些研究机构已开展应用 PCR 技术，进行动物细胞低温保存质量控制的研究工作，以及将 PCR 技术应用于人体白细胞分型、动物病毒污染检测和培养细胞系交叉污染鉴定的实际工作。

PCR 的基本原理是要在一堆混杂的 DNA 或基因中放大某个特定的 DNA 序列，最重要的是启动特定的 DNA 合成。整个反应分三个主要部分：PCR 模板 DNA 样品制备、PCR 扩增和 PCR 扩

增产物分析。

一、PCR 模板 DNA 样品制备

PCR 具有高度的敏感性，即使单个细胞样品均可获得阳性结果。从理论上讲，没有必要为 PCR 专门制备纯化的 DNA 样品，但实际工作中仍希望通过首先制备 DNA 样品以保证其扩增效果，因为反应体系中可利用的 DNA 模板分子越多，样品间交叉污染的机会就少。此外，扩增须在一定的时间内完成，如果待扩增样品中靶序列含量太低，没有足够的启动 DNA，则扩增产物量就不足，给分析带来困难。最为重要的是，许多样品中可能含有抑制 TaqDNA聚合酶活性的杂质，只有经过 DNA 纯化中的处理才能够消除这种不利的影响因素。所以，除了临床上某些快速诊断的需要，直接溶解细胞进行 PCR 扩增外，一般使用纯化的 DNA 样品作为模板进行 PCR 扩增。模板 DNA 样品制备的材料可以是微生物菌种、临床标本、血液细胞和细胞培养物等，由于研究目的不同，取材各异，但制备方法大同小异。这一节的中心内容是讨论细胞培养物的保存和质量控制问题，所以主要介绍细胞培养物中模板 DNA 的提取。

（一）试剂

（1）酚：氯仿：异戊醇（25∶24∶1，V/V），酚用 10mmol/L 的 Tris(pH8.0)溶液饱和。

（2）4mol/L 的乙酸钠 100ml，121℃灭菌 20 分钟备用。

（3）含 1% SDS 的 10mmol/L 的 Tris(pH8.0)液 1000ml。

（4）蛋白酶 K(25mg/ml)。

（5）异丙醇。

（二）操作步骤

（1）用试剂(3)液 20μl 悬浮 5×10^6 个细胞，于 95℃加热 5 分钟。

（2）冷却后加入 10μl 的试剂(4)液，于 55℃保温 1 小时或 37℃保温过夜。

（3）加等体积的试剂(1)液，于室温下抽提粗制 DNA 2～20

分钟，时间视抽提效果而定。

(4)加 1/5 体积的试剂(1)液和等体积的试剂(5)，于 -20℃作用 1 小时或过夜。

(5)于 12000r/min 离心 20 分钟，倾去上清，将沉淀 DNA 自然晾干，溶于 50μl 水中，必要时加 RNAase 去除 RNA。取 10μl DNA 液测量紫外吸收值以确定浓度。

二、PCR 扩增

(一) 试剂

(1) 缓冲液(厂商提供)。

(2) dNTPs：dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 1.0mmol。

(3) 引物：各 5μmol。

(4) Taq DNA 聚合酶(厂商提供)。

(5) 无菌石蜡油，121℃灭菌 20 分钟备用。

(6) 其他：0.5ml 的反应管，微量进样器，PCR 扩增仪。

(二) 加样

取 0.5ml 反应管一支，依次加入各反应组分，总体积为 50μl，其中缓冲液 40μl，dNTP2μl，引物 2μl，模板 DNA 样品 5μl，充分混匀，加入无菌石蜡油 30～50μl。

(三) DNA 变性

置样品反应管于 PCR 扩增仪上，于 95℃加热 3～5 分钟，使 DNA 变性。

(四) 加 TaqDNA 聚合酶

将样品维持在 72℃，用一次性加样器吸取 1μl TaqDNA 聚合酶，插入反应管下层水相，缓缓加入酶液。将反应管放回反应架中。

(五) PCR 扩增

样品于 72℃保温 15 分钟，再按 94℃1 分钟→60℃1 分钟→72℃1 分钟顺序反复循环 30 次，最后于 72℃延伸 7 分钟。

三、PCR 扩增产物分析

产物的分析方法很多，视研究对象和实验目的而选择分析产物方法。细胞质量控制的定性分析常采用琼脂糖凝胶电泳法分析

PCR扩增产物。

(1) 根据PCR扩增产物片断的大小选择琼脂糖浓度,一般浓度为0.7%～2.0%。

(2) 向扩增产物中直接加入10μl电泳指示剂(0.25%溴酚蓝),轻轻混匀。

(3) 取5～10μl样品加入1.2%琼脂糖凝胶加样孔中。凝胶中含0.5μg/ml的EB染料。

(4) 于100V电压下,电泳1～2小时。

(5) 电泳完毕,取胶置于紫外灯下观察,扩增阳性者,可见单一大小的区带。

(6) 将电泳结果照相,与标准样品比较,分析结果,作出鉴定分析报告。

第 10 章　动物胚胎的冻存

§10.1　动物精子的超低温冻存

动物精子的冻存研究已有 100 多年的历史，但是冻存获得成功却是近 50 年的事。目前，动物精子的冻存以牛、羊、马、猪居多，而能广泛用于授精的则以牛的冻存精子较为普遍。鉴于动物精子均为单细胞，所以冻存精子常采用标准的超低温冻存技术。精子冻存后活性的高低、授精能力的强弱，取决于动物精子本身的生物学特性和精子被膜的化学和物理结构上的差异，如人的精子对低温的抵抗力较强，而猪的精子则不然；奶牛的精子对低温反应迟钝，而肉牛的精子则敏感。动物精子对低温的敏感和耐受程度与其被膜结构直接相关。故动物精子的冻存在很大程度上就是通过改变冻存条件保持被膜结构的完整性，从而提高冻后存活性及授精率。

动物精子冻存方法可归结为安瓿冻存法、细管冻存法和颗料冻存法。

一、奶牛精子的安瓿冻存法

（一）稀释液制备

（1）3% 的柠檬酸钠溶液　柠檬酸钠（分析纯）6g，双蒸水 200ml，pH7.2。

（2）柠檬酸钠 - 卵黄稀释液　3% 柠檬酸钠液 70ml，卵黄液 30ml，充分混匀，备用。

（3）柠檬酸钠 - 卵黄 - 甘油稀释液　3% 柠檬酸钠液 70ml，卵黄液 25ml，甘油 5ml，充分混匀，备用。

（二）新鲜精液的采集

选择优质品质的公牛，常法采集精液备用。

（三）冷冻降温

（1）新鲜公牛精液的稀释　将新鲜动物精液与无菌甘油稀释液按1:4混合，30℃水浴保温30分钟。

（2）降温及平衡　将稀释精液置降温仪冷冻室内，以0.25℃/min的降温速率降温至5℃，按1:1的比例加入含甘油的稀释液，0～5℃平衡4～6小时。

（3）冻存　将平衡后的稀释精液快速分装安瓿，每支安瓿0.5ml，再将安瓿返回降温仪冷冻室，以1.0℃/min降至－15℃，再以3.0℃/min降至－150℃。然后将安瓿投入液氮贮存。

（四）冻后授精

（1）复苏　取出冻存安瓿，于37～40℃水浴快速解冻（最好在1分钟内解冻）。

（2）授精

① 选择情期母牛数头，并做好授精前的准备工作。

② 将复苏后的精液适当稀释，按常法人工授精，精心饲养。

（五）精子冻后质量评估

（1）冻存精子授孕观察　观察人工授精后母牛的妊娠率，计算授孕成功百分率。

（2）冻存精子授孕成仔观察　观察冻存精子授孕成仔的遗传性状，调查牛仔可能出现的畸形或遗传性状改变的分布情况。

二、绵羊精子麦管冻存法

（一）稀释液的配制

（1）普通稀释液　柠檬酸钠14.7g，卵黄250ml，青霉素100万u，链霉素2.0g，蒸馏水750ml。

（2）冻存稀释液　柠檬酸钠25.3g，果糖20.0g，卵黄250ml，甘油140ml，蒸馏水610ml，青霉素100万u，链霉素2.0g，充分混匀，备用。

（二）精液的收集

选择优良品种的公绵羊，常法采集精液备用。

（三）精液冻存

（1）初次降温　新鲜绵羊精液用普通稀释液对倍稀释，分装于冻存塑粒麦管（每支 0.3ml），将麦管置降温仪的冷冻室内，以 0.2℃ /min 的降温速率降至 5℃。

（2）二次降温　缓缓加入等体积预冷的冻存稀释液的麦管中，使其精液的终体积为 0.6ml，用聚乙烯醇封口。麦管装入金属网篮中，于 5℃平衡 3～5 小时，然后迅速将金属网篮置液氮容器的气相中预冻 20～30 分钟。

（3）贮存　精液经液氮气相预冻后，置液相中长期贮存。

（四）复苏及授精

（1）取出麦管冻存精液，于 30℃水浴速融。

（2）用普通稀释液适当稀释后按常法人工授精。

（3）参照方法一，观察冻存精子的授孕情况。

三、种猪精液的颗粒冻存法

（一）稀释液的配制

（1）稀释液　蔗糖 12.0g，卵黄 20.0ml，甘油 5.0ml，蒸馏水 75.0ml，青霉素 10 万 u，链霉素 0.1g。

（2）解冻稀释液　柠檬酸钠 2.9g，蒸馏水 100ml。

（二）精液采集

选择优良种猪，用常法采集精液，于 30℃左右保温。

（三）初次降温

将新鲜精液于 30℃保温，用稀释液稀释（1∶3），置冰箱内降温至 0～5℃，并保温 4～5 小时。

（四）二次降温

（1）精液冻存颗粒制备　取预冻精液 0.1ml，缓缓滴入超冷（－80～100℃）的塑料板上，使其快速形成冻结颗粒。

（2）冻存　超低温下收集精液冻结颗粒于预冷的微管内，封盖，迅速投入液氮冻存。

（五）解冻

取出冻存微管，加入 0.5ml 解冻稀释液，于 37℃水浴中速融。

(六) 冻存精液授精及观察

(1) 选择情期母猪数头,按常法人工授精,隔离精心饲养。

(2) 观察母猪妊娠情况,检查猪仔遗传性状稳定性,计算冻存精液人工授精率。

§10.2 鼠胚的超低温冻存

鼠是实验医学研究中最常用的实验动物。其一,鼠可以作为敏感动物,用来研究药物的毒性,几乎所有临床使用的药物均以鼠体内实验评估其毒性。其二,鼠经过特殊处理,使其成为动物模型,常用来研究肿瘤的诱生及癌变机制,测定药物的致癌或抑癌作用。此外,在国家法定生物制品检验、药物毒性标定、病原微生物毒力评价等方面,鼠的作用更是不可替代。然而,人工饲养的鼠,因近亲繁殖、自然发展,生存率在不断下降。加之环境条件不断改变,不利因素的影响,使鼠的基因型、表型常发生变异,给评估标准的制定带来麻烦。所幸的是,近二十年发展的动物体外授精、胚胎冻存及冻后移植,能较好地避免鼠的近交,使基因型、表型变异的发生控制在极低的水平上。可见,鼠的胚胎冻存不仅具有理论意义,又有实用价值。

一、小鼠两细胞胚的冻存

(一) 小鼠胚的预处理程序

(1) 胚的制备

① 雌鼠超数排卵及受精:

A) 选择健康的雌鼠数只,分别注射 5u 鼠血清促性腺激素,刺激雌鼠情欲使其排卵。

B) 48 小时后,再给雌鼠分别注射 5u 的人绒毛膜促性腺激素(hCG),促进超速排卵。

C) 将雌鼠与优良雄鼠交配,使其受精。

② 胚的收集与初步孵化:

A) 用常规手术从雌鼠输卵管中取出 2 细胞胚。

B) 将胚于含 hCG 的营养液中漂洗 43～45 小时后，取出浸泡到含 Hepes 缓冲液的 M_2 培养液中(pH 7.2～7.4)，放置于室温备用。

(2) 平衡液的配制

① 配制含 4mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)的 M_2 营养液 500ml。

② 用 M_2 营养液制备不同浓度梯度的 DMSO 溶液，最终浓度为 0.5mol/L、1.0mol/L、1.5mol/L。

(3) 胚的平衡　将胚置于冻存容器中，用平衡液(2)逐级递增浓度浸泡，使其平衡，其间放置 10 分钟。将充分平衡后的胚移至冻存管内(10～15 个/管)。

(二) 胚的慢速降温冻存

(1) 选择程控降温仪(作者实验室采用 Planer PTC 200 降温仪，England)，设置降温程序。

(2) 程序降温：

① 将经平衡的待冻存胚置于冷冻室内，以 -2.0℃/min 的速率降温至 -7.0℃，自动控制诱导冰核形成(时间 3～5 分钟)，继续保温 25 分钟。

② 胚置于 -7.0℃ 保温后，以 -0.3℃/min 的速率降温至 -80℃，迅速投入液氮贮存。

(3) 冻后复温　从液氮取出冻存胚，以 8.0℃/min 的速率升至 4℃以上，保证冻存胚已完全融化。

(4) 保护剂的稀释

① 用 M_2 营养液制备不同浓度梯度的 DMSO 溶液，其终浓度为 1.5mol/L、1.0mol/L、0.75mol/L、0.5mol/L、0.25mol/L。

② 从高浓度到低浓度，逐级滴加 DMSO 溶液，稀释冻存胚，最后一次稀释后于室温放置 10 分钟。

(5) 胚的活性检测

① 将稀释去保护剂的胚于适宜温度下培养 2～4 小时，常规检测胚的活性。

② 选择存活性好、形态正常的胚作体内移植成胎观察。

（三）胚的快速降温冻存

（1）冻存保护剂的制备　将 0.25mol/L 蔗糖、32mg/ml 牛血清白蛋白、1.5mol/L DMSO 用 M_2 营养液溶解（DMSO 应最后加入，避免牛血清白蛋白沉淀），pH 7.2。

（2）胚的装袋与平衡

① 选择优良胚 20 个左右，加入 30～40ml 的保护剂，于 20～22℃平衡 2～3 分钟，然后用毛细管将胚吸入塑料冻存袋中，快速热封口。

② 将胚袋置于洁净台面上展平 3 分钟，使胚尽可能均匀地分散至袋的内层表面。

（3）胚的冻存．快速冷冻降温的最大优点是不用程控降温仪，将平衡的胚袋直接投入液氮贮存。

（4）冻后复温　从液氮中取出胚袋、浸泡于 35～37℃水浴中（约 3～6 秒），使其快速解冻。

（5）胚的洗涤　剪开融化的胚袋，用毛细管吸取胚液到 2ml 0.5mol/L 的蔗糖液中，室温放置 10 分钟。如此操作重复 3 次以上，以达到充分洗涤去除保护剂的目的。

（6）冻后胚的直接观察评估活性　将洗涤胚置显微镜下观察，具有 1～2 个完整分裂球（blastomeres）的胚为存活胚，计数胚的活性数，计算存活百分率。

（7）冻后胚体外发育评估活性

① 先将活性胚浸泡于含 10% 胎牛血清的 Whitting－ham's T_6 营养液中。

② 用毛细管吸取 100μl 胚液，缓缓滴加到 30mm 无菌平皿中，制成悬浮微滴，并用液体石蜡油轻轻封盖微滴。

③ 将平皿置于 37℃、5% CO_2 培养箱内培养。培养 4 天后，冻存胚开始分裂，发育成胚泡。观察胚的发育情况，计算相对存活率。

（8）冻后胚体内移植评估活性

① 冻存胚经洗涤后，培养 2～5 小时。采用外科手术移植 5～

6 个胚到 3～4 月龄的雌鼠输卵管内，同时以未冻存的新鲜胚为移植对照。

② 用常规方法饲养雌鼠，观察雌鼠的腹部变化，监控胎仔发育情况。

③ 雌鼠怀孕约 15 天开始产仔，记录产仔率。

④ 逐个检查鼠仔，记录正常鼠仔与异常鼠仔的比例。

二、大鼠胚泡的冻存

（一）冻存保护剂系统

（1）1.5mol/L DMSO。

（2）1.5mol/L 1,2－propanediol（PD）。

（3）1.5mol/L 甘油。

（二）胚泡的平衡处理

（1）如前法制备大鼠胚泡。

（2）将胚泡置于洁净的平皿中，用不同浓度的 DMSO 或甘油平衡。DMSO 的浓度从 0.25mol/L、0.5mol/L、1.0mol/L 到 1.5mol/L逐级递增；而甘油的浓度则分两步递增，即从 0.75mol/L 到 1.5mol/L。两种保护剂在浓度递增时，放置 10 分钟，使胚达到充分的平衡。PD 无需逐级平衡，可直接加入 1.5mol/L 的浓度，使其平衡 15 分钟后，加 0.1mol/L 的蔗糖即可。

（3）将平衡后的胚泡直接移到含 0.25ml 1.5mol/L 浓度保护剂的塑料冻存管中。

（三）胚泡的冻存

（1）方法一　将悬浮胚泡以 －2.0℃/min 的速率降温至 －7.0℃，手动操作诱导冰核形成，保温 20 分钟，随后以 －0.3℃/min 的降温速率继续降至 －30℃，将冷冻胚泡快速投入液氮中贮存。

（2）方法二　将悬浮胚泡以 －2.0℃/min 的速率降温至 －7.0℃，自动诱导冰核形成，保温 20 分钟，随后再以 －0.3℃/min 的速率降温至 －80℃，将冷冻胚投入液氮贮存。

（四）胚泡冻后复温

(1) 将胚泡于37℃水浴复温。

(2) 洗涤去保护剂

① DMSO的去除:分别采用1.5mol/L、1.25mol/L、1.0mol/L、0.75mol/L、0.50mol/L、0.25mol/L的DMSO连续稀释冻存胚,每递减一种浓度,放置10分钟。

② 甘油的去除:采用0.75mol/L的甘油+0.25mol/L的蔗糖稀释,放置10分钟。

③ PD的去除:分别采用1.0mol/L的PD+0.25mol/L的蔗糖、0.5mol/L的PD+0.2mol/L的蔗糖、0.2mol/L的蔗糖+20%的血清递减稀释,其间放置5分钟。

(3) 胚泡保养　将最后一次稀释去保护剂的胚泡用Ham's F10培养液+10%胎牛血清的保养液浸泡,并适时培养,观察。

(五) 胚泡的观察

将胚泡置于立体显微镜下观察,按胚泡发育形态分类,用统计学分析(X^2试验)处理结果。通常胚泡冻存后的活性可保持在30%以上。

(六) 判断胚泡存活性的基本原则

冻存后的胚泡一般出现如下三种情况:

(1) 胚泡重复展平,无损伤痕迹,且保持完整的透明带。

(2) 胚泡不能完全展平,有少数细胞存在断裂痕迹,但多数细胞仍保持完整的透明带。

(3) 胚泡受损严重,多数细胞死亡。

一般认为,冻存后的胚泡出现(1)、(2)两种生活状态均为正常,视为存活;而第(3)种情况则视为死胚。

§10.3　羊胚的超低温冻存

自从1976年首次用超低温冻存羊胚并移植发育成羊仔以来,羊胚的冻存研究发展很快,已有许多胚冻存并移植成功的文献相继报道。其间发现多种低温保护剂对羊胚冻存均产生不利影响,

这除了保护剂本身的毒性外，渗透压的影响也比较突出。因此，许多学者对羊胚冻存前的保护剂分级平衡、冻后洗涤去保护剂及维持冻存液渗透压等关键因素不断进行改进，获得理想的效果。在这一节中，对这些实用程序重点讨论的同时，介绍冻存羊胚的技术程序。

一、羊胚的来源

(1) 挑选数只优良的健康母羊，向阴道置入含 60mg 孕激素的阴道栓，使其情期同步。

(2) 在孕激素栓塞 11 天后，分别给每只母羊肌肉注射总剂量为 20mg 的猪促滤泡激素(FSH－P)，使其超数排卵。注射激素可分次进行，日注射 2 次，三日内完成。

(3) 最后一次注射 FSH－P 后约 12 小时，分别给每只母羊肌肉注射 0.25mg 的促性腺激素(GnRH)。随后将母羊与成熟公羊合栏至少 24 小时，使其交配。

(4) 交配 6 天后，采用常规的外科手术从卵巢中取出胚，并用 PBS 漂洗液(PBS 含 2%的小牛血清、100μg/ml 的青链霉素)漂洗胚细胞，移去成团的细胞，留下单个的桑椹胚和胚泡备用。

二、羊胚渗透行为测定

(一) 渗透压溶液的配制

羊桑椹胚和早期胚泡对渗透压敏感，故冻存前有必要测定其最适的渗透行为。渗透行为采用 $CsCl_2$ 或蔗糖溶液分别测定，二者的浓度及渗透压差见表 10－1。

(二) 测定操作步骤

(1) 胚的等渗行为观察　将羊胚置于等渗的 CZB 或 PBS 液中浸泡处理，并用显微镜观察胚的变化。条件许可的实验室，可进行显微摄像，记录胚的动态变化。

(2) 胚的高渗透行为观察　将羊胚分别浸泡于逐级递增浓度的 $CsCl_2$ 或蔗糖液中(溶液Ⅰ或Ⅱ)，于 20～23℃下处理，每递增一种浓度放置 15 分钟，并依次进行显微观察，摄像。

(3) 胚细胞体积变化测定　测定单个胚的交叉剖面积，用

MOCHA 微机成像分析软件分析胚处于每种高渗溶液中的细胞体积变化，按下列公式计算：

$$V = 0.75225(A)^{1.5}$$

式中，V 为细胞体积；A 为胚的交叉剖面积。

表 10－1　　羊胚渗透压行为研究的标准溶液

溶　液	溶质浓度(mol/L)	总渗透压(Osm)	1/Osm
溶液Ⅰ($CsCl_2$)	0	0.286	3.50
(用 CZB 培养液配制，补加	0.120	0.497	2.01
0.02mol/L的 Hepes 和适量的酚	0.245	0.716	1.40
红)	0.438	1.048	0.95
	0.711	1.507	0.66
溶液Ⅱ(蔗糖)	0	0.299	3.34
(用PBS溶液配制，补加10%胎牛	0.125	0.416	2.40
血清)	0.250	0.625	1.60
	0.500	0.833	1.20
	1.00	1.666	0.60

三、羊胚冻存

(一) 冻前保护剂平衡

(1) 将羊桑椹胚和胚泡用 PBS 液(含 10% 胎牛血清)漂洗 2 次，分别用 0.25mol/L、0.50mol/L、0.75mol/L、1.25mol/L、1.5mol/L的 DMSO 液处理，使其充分平衡，其间停 5～10 分钟。

(2) 移取 2～3 个用 DMSO 保护剂平衡后的胚加到 0.25ml 容量的塑料冻存袋中，缓缓滴加 1.5mol/L 的 DMSO 液于袋中，使其充分浸泡胚，加热封口，于室温放置 10 分钟。

(二) 程控降温冻存

将胚袋置程控降温仪冷冻室内，快速降温至－7.0℃，保温 10 分钟，诱导冰核形成，然后以－0.6℃/min 的速率降温至－35℃，将胚袋快速投入液氮贮存。

(三) 冻存胚复温

从液氮中取出胚袋，空气停留 5－10 秒，置于 37℃ 水浴快速解冻。直接稀释法稀释，PBS 漂洗，常法测定胚的活性。

四、羊胚活性测定

（一）体外测定法

(1)培养微滴的制备

① 用微量加样器加 10μl Ham's F10 培养液（含 10%胎牛血清、100μg/ml 双抗）到无菌的 30mm 平皿中，尽可能地使液体不扩散。

② 移取经漂洗的冻存胚 2～3 个，轻轻滴到 Ham's F10 液微滴上，并用适量的无菌硅酮油封片，制成相对稳定的培养微滴。

(2)培养　将培养微滴置于 37℃、5% CO_2、5% O_2、90% N_2 的 CO_2 培养箱中培养 96 小时。

(3)胚的活性评估　观察胚的发育状态、分化程度，以其典型的胚发育形态学指标评估冻存胚的活性。

（二）体内测定法（成胚移植法）

(1) 母羊动情期的诱导

① 选择 2～3 只身体健康、性成熟的优质母羊，分栏精心饲养，使其充分适应周围环境。

② 向分栏母羊的阴道塞入孕激素栓，15 天后取出栓塞，肌肉注射 500IU 的雌马绒毛膜促性腺激素（eCG），次日补加注射 0.25mg的促性腺激素（GnRH），诱导母羊的动情期。

(2) 冻存胚的移植

① 取出液氮冻存的胚，解冻，漂洗，并用适宜的 Ham's F10 液保养。

② 在母羊经人工诱导进入动情期的 6 天后，采用割腹显微移植法向每只母羊移植冻存胚 2～4 个。其后精心饲养，观察母羊妊娠变化。

(3) 母羊妊娠期的诊断

① 隔周观察并记录冻存胚移植母羊的妊娠状况，包括食欲、腹部隆起程度等变化。

② 母羊妊娠期 45 天左右，用超声图像诊断仪测试胎仔发育情况。

(4) 冻存胚体内移植质量评估

① 待妊娠母羊正常产羊仔，观察羊仔的体态，记录正常或畸形羊仔的数量，记录每只母羊的产仔数。

② 计算冻存胚的移植存活率(%)，评估胚移植技术的可靠性。

③ 计算冻存胚移植的优质率(%)，评估胚冻存技术的优劣。

§10.4 水生动物胚的超低温冻存

水生动物胚冻存对于建立种质基因库，人工控制优良种质繁延的实施具重要意义。多年来，水生生物学家一直对鱼类、水生贝壳类胚的冻存进行探索，试图建立标准的冻存程序，对水生动物胚有效冻存，最终建立水生动物胚胎库，但收效甚微。最近几年，鱼胚冻存技术有所突破，在少数水生贝壳的胚冻存方面获得成功，其中英国学者 Zheng. T 等的研究工作较为突出，他们对斑马鱼(Zebrafish)胚冻存保护剂、降温速率、复温条件，甚至玻璃化冻存程序进行了深入仔细的研究，取得理想的结果。1994 年台湾学者报道，已成功冻存牡蛎(oyster)、蛤(hard clam)和小鲍鱼(small abalone)的胚胎，且复苏活性百分率达 60%以上。然而，鱼类的胚胎在冻存复苏方面均还存在许多急待解决的问题，尤其是淡水鱼胚冻存成功的例子不多见。为了促进水生动物胚的冻存研究，本节将介绍目前冻存海洋水生动物胚较为成功的程序。

一、冻存液的配制

以无菌海水为溶剂，分别配制 1.0mol/L、2.0mol/L DMSO 冻存保护剂(DMSO 毒性较丙烯乙二醇、乙烯乙二醇、乙二醇小，故广泛使用)，贮于 4℃备用。

二、胚的收集

采用人工授精或自然交配的方式，根据待冻存的水生动物种

类决定取胚时间:贝壳类4小时为宜,其它水生动物则可延长成胚时间。

三、胚的平衡

(1) 取1.0mol/L、2.0mol/L的DMSO,按不同体积与无菌海水混合,配成0.25mol/L、0.5mol/L、0.75mol/L、1.0mol/L、1.50mol/L、2.0mol/L的DMSO平衡应用液。

(2) 分别用不同浓度的平衡应用液逐级浸泡胚(平衡液可缓缓滴加到盛胚的容器内,使其完全浸泡)。其间放置10分钟。

四、胚的冻存

吸取0.25ml胚悬液到塑料冻存管中,置于程控降温仪冷冻室内慢速降温。通常采用-1.0℃/min的速率降温到-12℃,保温5~10分钟(诱导冰核形成),然后以-2.0℃/min的速率降温至-35℃,保温20分钟,迅速投入液氮贮存。

五、胚的冻后复温

将冻存胚置于28℃水浴快速解冻,用海水洗涤去除DMSO,将胚置于平皿中备用。

六、胚的活性检测

将洗涤后的胚置于海水中孵化,观察胚在海水中的运动能力,计数死、活胚的比例,计算活性百分率。

第 4 篇　植物材料的低温生物学

第 11 章　种质资源低温保存

§11.1　种质资源低温保存的原理

作物种子到生理成熟期，其活力也达到最高水平。以后，随着时间的推移，种子内部不断发生变化，活力随之下降直至失去活力而死亡。这一变化过程的综合效应叫做“劣变”(deterioration)。种子劣变是一种不可避免的生物学规律，其过程几乎是不可逆的。过程发生的快慢既为其遗传基因所决定，也受环境条件，特别是温度和湿度的影响。目前，人们还无力改变数以成百上千万不同物种的遗传基因，但可通过控制种子贮存环境的温度和降低种子含水量大幅度延缓种子劣变的过程。低温干燥的种子寿命往往比常温未干燥的种子寿命高出 10 倍、数十倍甚至百倍。这就是种质保存的基本原理。

一、影响种子贮存的内在因素

种子贮藏的寿命受 10 种特性和条件的影响。它们是遗传的特性；收获前的温度、光周期、矿质营养、降雨量和土壤水分；种子的构造和成分；种子的硬实；种子的成熟度；种子的大小、形状；种子的休眠；种子含水量；机械损伤和活力。

在相同的贮存条件下，不同物种甚至同一种内的不同品种之间其活力和寿命有很大的差异。Haferkamp 报道，在同一条件下贮存禾谷类 5 种作物的种子 31～32 年，经发芽率测定，以壮苗计算，大麦为 96%，小麦和燕麦为 85%，玉米为 70%，黑麦只有 1%，差异很大。又如贮存 32 年的三个大麦品种，壮苗率分别为 96%、80%、72%，可见品种间差异也很明显。受遗传特性决定，种子的寿命可分长命、中命、短命三种：短命种子寿命小于 3 年，中命种子为 3～15 年，长命种子为 15～100 年甚至更长。在长命种子中，以豆科作物居多。长、中、短命种子的寿命是在常温条件下划分的，如贮存条件变化，寿命长短可大不相同。例如，花生为短命种，但贮存在低温密闭条件下，其寿命不是小于 3 年而是在 8 年以上；大麦为中命种，把其密封在玻璃管中存放 123 年，仍有 12%的发芽率。

气候是影响种子生活力和耐贮性的最明显的收获前因子，特别是季节的变化。在田间种子成熟晚期和后熟期间，过多的水分和冰冻的温度对种子的寿命和耐贮性影响很大。有人对 1929 年和 1930 年生产的 4 个亚麻品种的种子进行贮存试验。1930 年的种子在收获前受过冷害，贮存 6 年后测定发芽率，1930 年生产的为 1%、4%、9%和 1%，1929 年生产的同一品种的相应发芽率为 94%、86%、94%和 86%。这个例子充分说明气候对收获前种子活力影响之大。

种子的成熟度是影响种子贮存寿命的重要因素之一。研究表明，健康、成熟、饱满的种子比未成熟的种子耐贮藏，禾本科牧草种子不同成熟期的贮存试验说明这一点。其他大田作物种子，如花生、玉米、菜豆、棉花等的试验也取得类似结果和结论。各种蔬菜种子也类似。

种子含水量、收获时种子的机械损伤以及种子的活力等都是影响种子贮存寿命的重要因素。收获时相对干燥的种子，或者在收获以后很快降低高水分种子的含水量是很重要的。收获时的种子的机械损伤，造成种子破皮和程度不同的损伤都会影响种子的贮存寿命。种皮、内稃、外稃的破损，不仅水分易于进入，菌类也会

通过种皮上的裂痕侵入种子，降低种子的贮存品质。新鲜而生活力旺盛的种子，比陈种子具有较大的贮藏潜力。还有些学者发现，种子的耐藏性与种子的一些性状或形态特征有关，如黑种皮鹰嘴豆比浅色种皮的耐贮性好；其它颜色种皮的菜豆比白色的好；光皮豌豆比皱皮豌豆的贮性好，红皮小麦比白皮小麦好等。

二、贮藏环境对种子寿命的影响

种子的贮藏条件，特别是贮藏温度和湿度对种子的老化劣变的影响很大。高温高湿条件下，种子劣变快，生活力下降大。低温条件下，种子劣变慢，生活力下降小。1961 年，Borton 对洋葱、番茄、莴苣、花生、亚麻及松树种子进行了不同温度、不同相对湿度的试验，经过不同的贮存时间，种子发芽率表现出很大的差异，试验结果见表 11－1。

表 11－1　贮藏在不同温、湿度中的种子发芽率(Borton，1961)

种类（贮藏前的发芽率）	环境中的相对湿度（%）	在下列的贮藏天数中种子的发芽率（%）															
		5℃					10℃					20℃					30℃			
		8	43	150	232	372	8	43	150	232	372	8	43	150	232	372	8	43	150	232	372
莴苣（63%）	35	59	79	71	73	67	51	78	66	70	53	56	69	63	59	32	46	68	33	41	2
	55	50	80	78	75	50	44	69	65	57	22	45	62	51	43	3	41	51	16	6	0
	76	50	67	67	68	36	57	64	1	7	0	58	46	1	0	0	52	4	0	0	0
洋葱（66%）	35	56	67	62	57	55	38	63	47	53	35	58	61	45	32	29	54	47	16	13	15
	55	51	70	69	58	53	62	50	33	29	16	41	15	5	9	3	17	11	2	1	4
	76	41	67	59	44	27	55	62	30	17	13	51	15	1	1	1	33	3	0	1	0
番茄（93%）	35	94	88	91	91	94	88	91	92	92	91	87	90	93	88	90	90	89	92	88	91
	55	94	93	92	91	90	90	91	93	86	89	86	85	89	96	89	94	89	86	87	83
	76	89	92	89	89	88	92	87	88	75	76	92	83	83	73	45	89	86	32	0	0
亚麻（97%）	35	97	97	89	98	98	91	94	95	95	92	93	91	95	95	86	93	97	86	91	83
	55	96	97	88	95	96	96	97	96	93	85	94	94	90	87	90	96	98	90	79	74
	76	92	96	92	88	94	94	97	78	79	71	98	96	78	60	32	94	94	1	0	0

续表

种类（贮藏前的发芽率）	环境中的相对湿度（%）	在下列的贮藏天数中种子的发芽率（%）																	
		5℃						10℃						20℃					
		8	43	150	232	372	8	43	150	232	372	8	43	150	232	372	8	43	150	232	372
松树（96%）	35	69	72	54	58	-	83	59	56	35	-	76	82	73	67	-	82	45	31	19	-
	55	76	71	71	70	-	87	50	47	24	-	84	40	28	24	-	60	11	0	0	-
	76	90	59	52	41	-	87	49	15	3	-	61	26	0	0	-	68	1	0	0	-
花生（96%）	35	98	100	98	100	-	98	100	96	100	-	100	100	98	100	100	100	100	98	97	-
	55	98	199	94	100	-	98	100	98	96	-	96	98	98	100	100	98	100	98	98	-
	76	100	100	100	100	-	94	98	95	96	-	96	98	82	42	-	98	96	0	0	-

Harington 在 1963 年提出了种子水分和温度与种子寿命之间相互关系的经验估计法则：① 当贮存温度在 0～50℃之间，温度每降低 5℃，种子的寿命可延长一倍；② 当种子水分在 4%～14%之间，种子的含水量每降低 1%，种子寿命也可延长一倍。哈氏法则有其局限性，特别是对种子的中、长期低温贮藏，他并未指明水分、温度与种子寿命之间的相互关系该是怎样。1972 年，Roberts 在其研究结果的基础上提出了一个较为严密的种子寿命方程式：

$$\log\bar{P} = K_r - C_1M - C_2t$$

式中，$\bar{P}$ 为种子平均寿命；M 为种子含水量（%）；t 为温度（℃）；K_r、C_1、C_2 为常数。水稻等 5 种作物种子经多次贮藏试验的结果推算出 K_r、C_1 和 C_2 的常数值列如表 11－2。

表 11－2　水稻等 5 种作物的 K_r、C_1 和 C_2 常数值（Roberts，1972）

作物名称	K_r	C_1	C_2
水　稻	6.531	0.159	0.069
小　麦	5.007	0.108	0.050
大　麦	6.745	0.172	0.075
蚕　豆	5.766	0.139	0.056
豌　豆	6.432	0.158	0.065

有了常数值就可以推算某一作物种子的平均生活力周期。例如，某一水稻种子含水量为10%，贮藏温度为10℃，生活力降低到50%的可贮藏年限为 $\log\overline{P}_{50}=6.53-0.159\times10-0.069\times10=4.251$。查反对数表得 $P_{50}=1782$ 天，约为4.88年；如含水量仍为10%，贮藏温度为0℃，P_{50}约为17.5年。由此可见，贮藏温度对种子寿命影响之大。假设贮藏温度仍为0℃，而种子含水量不是10%而是5%，可算得 $P_{50}=100$ 年。可见降低种子含水量对种子贮存寿命的巨大影响。但是不可理解为种子含水量降得越低，贮存寿命越长。它有一个极限含水量或称临界含水量，种子干燥到临界含水量时如继续往下降，贮存寿命不是更长而是更短，甚至死亡。不同作物的种子临界含水量不同，干燥种子时要特别留意。

这里需要指明，本段讨论的是贮存环境的温湿度对种子寿命的影响，是外因，而种子含水量是内因。实际上，环境湿度的变化主要影响种子的含水量：环境湿度高，种子含水量亦高；环境湿度低，种子含水量亦低。但是在现代种子低温低湿保存中，降低贮存温度易于办到，且在降温过程中会使环境湿度升高。既要低温又要低湿就难以办到，除非添置除湿设备，除增加设备投资外，还增加大量能源消耗，不合算，也不易办到。而贮存前先在特设干燥系统中把种子含水量降到长期贮存的标准，一般种子5%～6%，最高不超过7%，然后将种子密封包装，不控制环境湿度也能达到低温、低湿的贮存要求。此法操作简便又节省能源，已为越来越多的种质库采用。我国国家种质库的温、湿度指标是：库温为－18℃±2℃，库内相对湿度控制在50%±7%。这个湿度既可防止库内设备（库体表面、种子架、种子盒等）生锈损坏，又可确保万一个别种子盒密封不严而使种子含水量增高而降低种子贮藏寿命。

在诸多影响种子寿命的因素中，温度和湿度是两个最基本最主要的因素。人们难以改变种子的遗传特性和生化组分，而控制种子的贮存温度和含水量却是容易办到的。

三、低温保存延长种子寿命的机理

（一）种子含水量与种子寿命

种子水分可分为结合水与自水水两类及其中间过度形式。水分子与组成种子的有机物质中的化学基团以氢键或氧桥等相连结的叫结合水，它们一般不直接参与生化反应。在细胞微孔间自由移动的水分叫自由水，它们参与生化反应。在常温下，外界相对湿度高，种子吸水，种子含水量随自由水增加而变高；反之，种子含水量降低。种子含水量与相对湿度的关系可用吸湿等温线表示，多数作物种子的吸湿等温线呈反 S 形，见图 11－1。

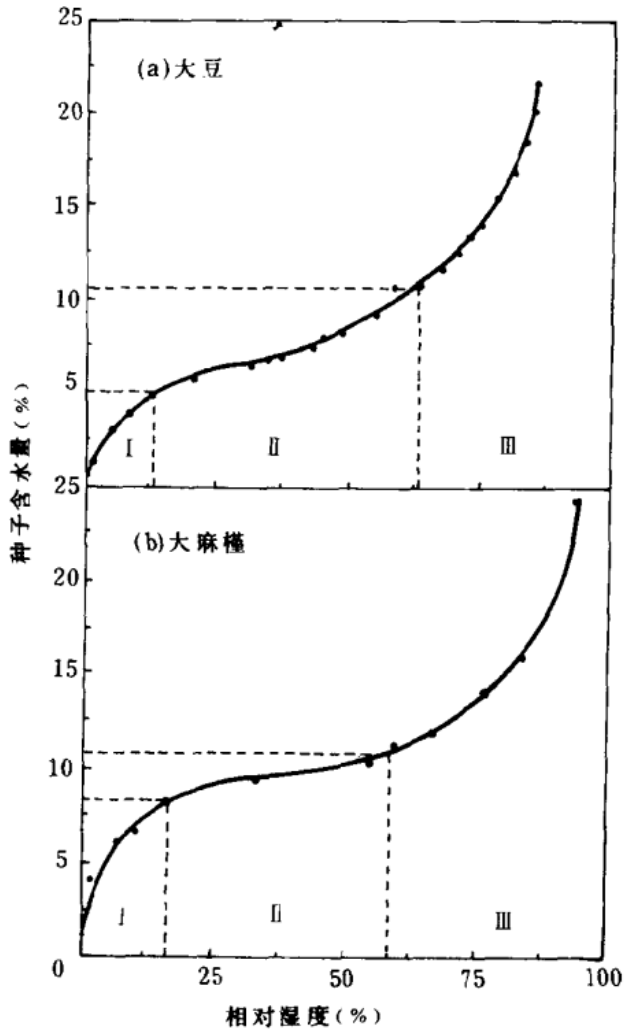


图 11－1　大豆与大麻槿在 20℃下种子含水量与相对湿度的关系
[Vertvcci(1984)，Mahawa(1982)]

此吸湿等温线可分为三个区：Ⅰ区，随相对湿度增加，种子含水量迅速上升；Ⅱ区上升缓慢；Ⅲ区又呈迅速上升趋势。Ⅰ区为结合水，Ⅲ区为自由水，Ⅱ区为过渡区。种子含水量降低，酶活性钝化，水分减少到一定程度时，底物就难以转运到酶处，辅酶也难以运转到主酶处，同时辅助因子镁、钙、钾、钠等离子也不能运转到相应的部位，即使有催化物生成，也会因缺水而影响扩散，使后续生化反应无法进行或者只能缓慢进行。在这些复杂的生化反应过程中，以自由水的影响为大；结合水对胚和子叶的蛋白变质、生活力下降影响很小。种子含水量低，其生理代谢减缓，养分消耗减少，呼吸变弱，蛋白质变性速度变慢，使种子生活力延长。种子含水量少还可抑制种子表面或内部真菌的活动，含水量低，游离脂肪酶钝化，种子霉变不能发生。所有这些都是延缓种子老化、劣变、失活的内在机理。长期贮存种子的含水量定在5%～6%，最高不得超过7%，正相当于图11－1中Ⅰ与Ⅱ区的交界处，基本不含自由水，所以是安全可靠的。但对大豆来说，含水量不得低于8%；否则，过低的水分也会影响种子的寿命。

（二）贮存温度与种子寿命

温度与种子的代谢活动强度、酶活性、微生物、仓贮害虫等直接有关。首先，温度与酶活性关系密切。高温可引起酶蛋白的变性和钝化。温度低，酶促反应速度下降。酶在干燥状态下比潮湿状态下对温度的耐受力高，低温干燥有利于种子中酶活性的保存。其次，呼吸作用是种子新陈代谢的主要特征，种子含水量高，呼吸作用旺盛，消耗大量的种内物质并释放热量，有利于微生物活动，促使种子劣变而丧失活力。干燥种子保存在低温下，呼吸作用弱。第三，蛋白质及其大分子结构(DNA、RNA)物质在高温下不稳定，容易变性，膜也因此损坏。低温使分子运动速度减慢，处于相对稳定状态，种子的组成成分不易发生变化。还有，微生物、霉菌、害虫在高温下易发生对种子的危害。低温下可避免这些危害，有利于保持种子活力，延长种子寿命。

§11.2 种质资源低温保存的主要方式

一、低温种质库保存

按种子在库内贮存的预期寿命长短分为长期库、中期库和短期库。

(一) 长期库

长期库温度为 -10℃ ~ -20℃,库内相对湿度<60%。种子容器为密封的金属盒、复合铝箔袋、玻璃瓶等。种子含水量 5% ~ 7%,预期寿命 50~100 年,甚至更长。1976 年,原国际植物遗传资源委员会根据有关专家的建议曾提出长期库参数的参考标准:种子贮藏在 -18℃ 或更低的温度条件下,含水量 5% ±1%(以湿重为基础),并封入不透气的容器内。我国国家种质库就是按照这一推荐参考标准建造的。世界上也有不少长期库达不到这一标准,有 -5℃ 的,也有 -10℃,但都算长期库。各国长期种质库均作为其作物种质资源的基础材料保存库,一般不向外提供和分发。只有当某一资源在外界因各种原因而不复存在,才从长期库取出增繁。

(二) 中期库

中期库温度范围为 0~10℃,相对湿度<60%。装种容器密封,种子含水量 6% ~9%,种子预期寿命 15 年以上。中期库又称流动样品库,它承担种子的分发、鉴定和育种任务,因其消耗量比较大,贮存数量要比基础样品多。在中国,各省(市、自治区)农科院和有关专业研究所已建不少中期库,负责中期保存当地资源并向国家库提供长期保存的种子资源,也要开展对种子综合评价和鉴定工作。

(三) 短期库

短期库温度范围为 15~20℃,相对湿度为 50% ~60%。种子容器可密封亦可不密封,装种容器主要有纸袋、塑料袋、布袋、玻璃瓶、金属罐等,种子含水量为 12% 以下,种子预期寿命 2~5 年。

短期库又叫工作库，是为各科研单位、大专院校、有关种子部门在开展工作中短期保存种子所用，种子经常进出。短期库的建造没有长期库和中期库严格，标准较低，因此无论建筑费用或运行维护费用都低得多。

二、超低温保存

保存温度在－80℃以下就可称之为超低温，一般以液态氮（－196℃）为冷源。生物材料在此低温下，新陈代谢活动基本停止，贮存中种子活力降低极慢，遗传变异不可能发生。利用液态氮可以安全地保存许多作物的种子、花粉、分生组织、芽、愈伤组织和细胞等。这种保存方式不需要机械空调设备及其它管理，冷源是液氮，容器是液氮罐，设备简单，保存费用只相当于种质库保存的 1/4。入液氮保存的种子不需要特别干燥，一般收获后，常规干燥种子即可，也能省去种子的活力监测和繁殖更新，是一种省事、省工、省费用的种子低温保存新技术。目前尚待进行保存技术、解冻技术的进一步完善。

三、在冷凉干燥地区保存

在冷凉地区保存作物种质资源是为了节省运行能源消耗从而节省保存费用。俄罗斯计划在北极附近的永久冻土带构筑种质库，那里气候严寒，常在－30～－40℃，甚至更低，不用降温就可达到低温保存的目的。北美和北欧已经成功地利用石灰岩岩洞作冷库，这些岩洞能够廉价地进行改造，通过 6～9 个月的连续冷冻形成一个永久的至少延伸至岩石 10m 的冻结区，将欲存种子按序放入，再作必要的隔热、降温处理，将洞口密封。用这种自然岩洞贮存种质资源，费用相当低。

我国也在冷凉的乌鲁木齐和西宁建成两座自然贮存库，用作中期库，贮存效果也很理想。在新疆乌鲁木齐市，保存 19 年的小麦品种平均发芽率为 78.3%，保存 11 年的水稻品种平均发芽率 87.6%，保存 12 年的玉米品种平均发芽率也为 87.6%。西宁自然库的保存效果也很好，如 1982 年存入的小麦种子，入库前发芽率为 96.5%，4 年后发芽率为 88%，年平均降低 2.1%；保存的玉

米入库前发芽率为100%,4年后为98%,年平均降低0.5%。

四、试管苗保存

依靠无性繁殖的作物,如甘薯和马铃薯等,难以用种子保存,可采用试管苗方式保存,又称分生组织保存。植物的细胞、原生质体、花药、花粉、分生组织、胚、愈伤组织和细胞悬浮液等均可通过试管培养和贮存。种质资源保存的目的是保存作物的遗传种性,而试管苗保存是保存材料的继代培养,不断繁殖更新。要保持作物种质的遗传完整性,必须选择适当的外植体作起始培养材料。尽管原生质体、愈伤组织和细胞悬浮液等也能培养成再生植株,但往往容易产生体细胞的变异。而具有器官分化功能的胚和茎尖能保持发育的完整性,在遗传上是稳定的。试验说明,茎尖具有整个植株的遗传基础,适宜用作种质保存的起始培养材料。而且在保存无病种苗上,茎尖也是适宜的外植体。其方法是将植株的茎尖取下接种在含分化培养基的试管中,在适宜温度和光照下培养,生根长茎后转入含生长培养基的试管中,待幼苗长到10cm左右时,即可置于低温下(不同作物用不同低温,甘薯16～18℃,马铃薯8～10℃)保存。一般经一年左右,取下试管苗茎尖,放入新试管中,生根长茎转管培养保存,继代培养,可无限期延续下去,达到长期保存的目的。

试管苗保存的优点很多:首先它解决了一些无性繁殖作物种质资源的低温、长期保存问题,可有效避免资源的丢失;第二,可节省土地和劳力,保存方法简单,花费少且能在保存中脱毒;第三,在提供利用时,可快速繁殖,也有利于国内国际种质交换。

五、低温冰箱(柜)保存

家用或医用低温冰箱或冰柜对保存种质量少或小粒种子非常适合,有时为少量种子建冷库是不合算的。冰箱(柜)可以放在任何适当的地方,温度可在－18～－21℃之间,内容积有不同规格,有立式和卧式之分。立式冰柜占地小,种样易存取,但开门时冷量容易散失,通常也较贵。卧式冰柜内温度的稳定性和可靠性高,以及积霜少是其优点,如果空间允许应优先选购卧式冰柜。此后依

资源的增多可再增购一个至数个，成为保存种质资源的低温冰柜组，北欧基因库就是这种办法。

中国农科院山东青州烟草研究所，在经费短缺、库房设备不完善的情况下，考虑到烟草种子体积极小，千粒重仅 0.05～0.09g，每克种子有 12000 粒，保存 10～20g 种子就可满足较长时间内鉴定研究和利用的需要，采用一个 386L 的低温（－10℃）卧式冰柜，代替低温库房，不仅节省了 10 万元已建库房制冷设备的购置费，还节省了制冷运行、维护和管理费。目前已保存烟草资源 3000 份左右。

除低温冰箱（柜）用于保存种质外，活动冷库保存也是一种。活动冷库可使温度低达－20℃，其容量范围介于 25～55m^3。活动冷库亦可为远离主要种质库的地区提供临时的或长期的贮存设施。为防止断电，有条件的还应有一台备用发电机。

六、复份保存

世界上无论哪个国家，如果将其作物种质资源集中在一处保存，那是十分危险的。如遇不可预见的和难以抗拒的天灾人祸，将可能造成种质资源的全部毁坏，损失难以估量且不可挽回。为防止万一，很有必要将每份种子的一部分存在异地，称之为复份保存。复份保存的条件（贮存温度和种子水分）应尽量与原保存库一致，这样可以省去种子贮存期间的活力监测工作，若需更新则可与原保存库同步进行。例如，菲律宾国际水稻所保存的水稻种子，一部分复份保存在美国，一部分复份保存在日本。北欧五国利用挪威的废弃矿坑，复份保存了各自的部分种质。该矿坑终年自然温度为－3.7℃，条件尚佳又节省能源。“八五”期间，我国在气候冷凉干燥的青海西宁建成容量为 40 多万份的国家复份种质库，已复份保存了与北京国家种质库数量等同的 30 多万份种质资源，成为目前世界上最大的、复份保存最多的国家复份种质库。

§11.3 作物种质资源低温保存的程序和技术

一、国家种质库种子入库程序

(一) 种子接纳登记

种子接纳登记是指种质库接收繁种单位送存种子的交接过程。接收方按国家库种子数量和质量要求对送存种子进行验收和登记。数量要求是:小粒种子(千粒重 5g 以下)50g,中粒种子(千粒重 20～100g)6000 粒,大粒种子(千粒重 100～400g)2500 粒,特大粒种子 1000 粒,外加种子活力检测损耗 15% 的数量。质量要求是:有检疫证书,未拌农药,发芽率 90% 以上,干净,无破皮破粒,无虫蚀粒、秕粒、瘦小粒、杂粒,种子含水量符合国家规定。送存的每份种子要按记载标准填写资料档案,品种清单顺序号、全国统编号、省保存号、繁种年代等都要登入资料档案,输入计算机。种子数量、质量符合标准,送存种子资料齐全,接收人给送种人员开接纳收据。新接收的种子若不马上入库,就需先把它们放在临时库存放。临时库温度控制在 20℃ 以下,相对湿度＜50%。种子短期存放一般不超过半年,对活力影响不大。

(二) 查重去重留取种样

随着入库种质数量的增加,查重去重已成为种质贮存入库程序中的重要一环。因为同一品种在同一种质库重复保存没有必要,它不仅占用有限的贮存空间,而且入库前的加工处理要耗费人力物力财力。就目前情况看,省际间、地际县、县际间的引种活动久已有之,现今更加频繁,同种同名、同种异名层出不穷。查重去重也只能查出同一省同一地的送存种子,异省异地的重复却难以避免。虽然有全国统编目录,大多各报各的,逐个按品种性状认真核对往往显得十分不足。查重的方法有两个:一是通过计算机查重,速度快,效力高,但基础数据的输入必需事先做好;二是人工卡片查重,速度很慢,已不适应数十万种质的查重需要。计算机查出重复后,还要认真进行人工核对,必要时拿出种样对比,确定某一

品种系重复就要把该种子退还送种单位。

从查重去重中看出留取种样是必要的。但种样的作用不限于此，在种子入库加工过程中，很难避免撒种、混种、混号，这时就需拿出种样核对，把混了的种子分开，把放错的号码改过来。种样一般放在小牛皮纸袋中，标明号码，按序按类永久保存。留取种样的粒数一般不得少于30粒，大粒和特大粒种子可适当少留。

（三）种子薰蒸

繁种单位繁育的种子比较集中地送到国家种质库，但种子送来不可能马上入库，不得不临时存放起来。种子在临时存放期间，其表面带有的菌类、虫卵，一旦条件适合，便会繁衍肆虐，使种子变霉生虫。一旦出现这种兆头，就得对种子进行薰蒸处理。薰蒸剂有多种，使用不当会使种子生活力降低。因此，选择毒性较小、杀虫杀菌力强的薰蒸剂至关重要。常用的有磷化铝，为灰白色固体，分片剂和粉剂两种，由红磷与铝粉在镁条燃烧下制成。它化学性质极不稳定，易于分解，产生磷化氢气体。PH_3是一种无色剧毒气体，具有乙炔气味，略重于空气，渗透和扩散性均较强，对人也有毒害作用，薰蒸时，箱体必须密闭。国家种质库种子薰蒸间内备有把三个薰蒸箱连为一体的薰蒸箱系统。每个薰蒸箱的外形尺寸是1800mm×800mm×600mm，内等分为8层，间隔200mm，隔板上有均匀的小孔，以利气体均匀分布。种子薰蒸时，用纸袋装种，敞口，均匀放在每层的隔板上，在箱内最下层放入适量磷化铝，关闭箱门和管路阀门。为确保密封，箱门周边再以不干胶条封贴一遍。磷化铝吸水生成磷化氢，杀灭虫卵和幼虫，72小时后，打开屋顶排风扇和箱子入气口阀门，箱内有毒气体由管道排入高空。待箱内毒气排净，才可开箱取种。

应着重指出，未发现幼虫就不要对种子进行薰蒸处理。因为薰蒸对种子生活力也有影响，从而会影响到种子长期贮存的寿命。

（四）种子精选

种子精选是种质入库前处理的主要流程之一。通过精选，去除破碎粒、虫蚀粒、无胚粒、秕粒、瘦小粒、杂粒等，选取色泽一致、

纯度高的饱满种子。种子精选有筛选、机选、目选、手选等多种方法。先用种子精选机去掉碎屑、秕粒、石子等，再用手选，去掉色泽不正、破皮破粒种子，使种子达到入库标准的纯净程度。国家库使用的精选机有 XZ－1 型种子精选机和 XZ－2 型种子精选机各两台。XZ－1 型种子精选机适于中小粒种子的精选，精选精度高但速度较慢。XZ－2 型种子精选机精选速度快，适于中大粒种子的精选。精选后的种子才可进行种子生活力测定。

（五）种子生活力测定

种子发芽势和发芽率是标志种子活力状况的具体生理指标。作为长期贮存的各种农作物种子，必须有最理想的发芽势和发芽率。各种农作物种子因其种性与起源产地不同，其最理想的发芽势和发芽率也不尽相同。因此对入库长期保存的各种农作物种子，规定了不同的最低标准（见表 11－3）。测定种子的发芽势和发芽率是种子入库处理的关键流程之一。达到规定指标的种子才能进入下一个流程。达不到规定指标的种子，要退繁种单位重新繁种。测定种子发芽势和发芽率的主要设备是种子发芽箱。种子发芽箱性能好坏直接影响发芽势和发芽率的可靠性和准确性。使用前，按照不同作物种子的发芽条件进行了严格的调试，以保证发芽箱性能良好，运行可靠。发芽能力以小麦、水稻等中粒种子为例，每天可以处理种子 224 份，满足了日处理种子 200 份的要求。不同作物种子要求的发芽温度、湿度、光照、时间等条件不同，按国际种子发芽检验规程严格执行。需要特别指出的是不少种子具有休眠习性，发芽时要特别注意，对休眠种子发芽前要做破眠处理。破眠方法多种，种间有异，对不同种子要采取不同方法。切不可不破眠就去发芽，这样测定的发芽势和发芽率极不准确，误把休眠种子当成没有活力的种子退还繁种单位重新繁种。种子生活力检测具体步骤是：

① 数种：每份种子的活力测定必须重复三次．依作物种子大小不同，有数 100 粒×3＝300 粒的，也有 50 粒×3＝150 粒的。小粒种子人工数，中、大粒种子可用数粒板数。

表 11－3　　各类农作物种子入库的发芽率标准

作物名称	发芽率（%）				备注
	栽培种	野生种	特殊遗传材料	野生近缘植物	
水稻	90	80	85		野生稻还要种茎保存，杂交稻三系和南方粳稻 85%
小麦	90	80	80	50	长江以南、高寒地区及国外材料 85%，赖草属 30%
大麦	90	60	50		长江以南、高寒地区及国外材料 85%
燕麦	80	70			
玉米	90				甜糯玉米及个别国外材料 80%
高粱	85				
谷子	85		70	50	不育系 60%，金黄狗尾草及国外引入少量稀有种 30%，包括珍珠粟、食用稗和龙爪稷。台夫 50%
其他粟类	85				
黍稷	85				
荞麦 苦荞	80	50			
荞麦 甜荞	70				
大豆	85～90	85～90			长江以南 85%
食用豆	85～90		75～80		绿豆、蚕豆、利马豆、多花菜豆、四棱豆、饭豆、木豆、黎豆、扁豆为 80%，其他为 85%～90%
棉花	90	70		80	
亚麻	90	70			
黄麻	90		80	90	
大麻	80	60			
红麻	90	75		80	
花生	85	60			

续表

作物名称	发芽率（%）				备注
	栽培种	野生种	特殊遗传材料	野生近缘植物	
油菜	85	60			
芝麻	85	80			
苏子	90				
红花	75				
向日葵	90	60			
蓖麻	90				
甜菜	80		70		单粒种 60%
绿肥	85				小冠花 60%，草木樨、田菁、金花菜、沙打旺 70%，苕子及其他小量绿肥 80%
牧草 豆科	80	50			杂草类 50%，热带牧草 30%～60%
牧草 禾本科	60～80	50			
西瓜	85	60	80（四倍体）		
甜瓜	85				
籽粒苋	85				
薏苡	75				
藜	90				野生种参照牧草 50%
蓼	75				
地肤	85				
蔬菜	85				绿叶蔬菜、葱韭类、胡萝卜、冬瓜、丝瓜、瓠瓜、茄子、辣椒及其他稀有蔬菜不低于 80%

② 破眠、浸种、置床：对需要破眠的种子要先做破眠处理，对需要先浸种的先浸种后置床。置床前，须先用酒精对发芽皿消毒。置床基质依不同种子检测技术分别采用蛭石、海绵或滤纸，加适量

水。把待发芽种子均匀摆到发芽皿内，送入发芽箱发芽。

③ 发芽势、发芽率计算：种子送入调好温度、湿度、光照的发芽箱内，一般种子 5 天数发芽势，7 天数发芽率，取三次重复的平均数，把数据输入计算机，记录资料要装钉存档。

④ 判断发芽结果，做出妥善处理：发芽率符合入库标准的种子可以进入下一流程，不符合入库标准的退繁种单位重新繁种。

（六）种子干燥与包装

（1）种子干燥　影响种子寿命最重要的因素之一是种子含水量。一般来说，贮藏种子在其“临界”含水量之前，越干其寿命就越长。以食用豆为例，在干燥气候下收获的种子含水量通常为 8%～11%，如果把这些种子置于密封容器中冷藏，这些种子没有冻害危险。然而，假如把种子含水量干燥到 5% 或 6%，种子寿命就增加 16 倍；如再把含水量降低到约 4%，其寿命又增加大约一倍；如含水量低于 2%，便会发生种子过干危害，种子活力降低，寿命缩短。由此看出，2% 就是某一食用豆的“临界”含水量。换言之，种子含水量从 8% 干燥到 2%，随含水量的减少，种子贮藏寿命会增加；含水量＜2%，越干寿命越短，甚至死亡。为了延长种子长期贮藏的寿命，对种子进行干燥是十分必要的。因此，把发芽率符合入库标准的种子进行干燥处理就成为种质入库前处理的重要程序。

种子干燥的温度至关重要。用高于 40℃ 的温度干燥种子，随着温度的升高，种子活力会明显降低。因此，作为长期贮藏的各类农作物种子，干燥温度通常都控制在 40℃ 以下，而且干燥温度越低，干燥过程中对种子活力的影响越小。国际植物遗传资源委员会推荐使用的种子干燥方法是：设一干燥间，温度保持 15℃，相对湿度为 10%～15%，经几个星期，甚至几个月，种子含水量降到 6% 以下。这是种子干燥最理想的方法。但这种方法对每天有很多种子需要干燥入库的种质库来说是不适宜的。我国在“七五”期间要入库种质 20 万份，去掉节假日，每天必须干燥 200 份才能完成入库任务，我们采用的方法因作物种子组分、大小不同而不同：

① 淀粉型种子：大多数禾谷类种子属此类型，在 20～25℃、相

对湿度20%～30%的干燥间，即使长期干燥也很难达到入库含水量要求，宜采用38℃加热干燥箱干燥此类种子。具体操作程序是：A）对送来的发芽合格种子要逐个清点、排序，做到不缺不乱，及时记在本上。B）抽测种子原始水分，对需要干燥的种子装筛、装袋，放号扎口。C）据此类种子对干燥所需温度的要求，调节干燥箱的控制温度，待温度稳定，将装种袋（筛）按序平摆在有隔层的干燥箱中干燥，并随时观察干燥间、干燥箱的温、湿度变化和运转情况，发现问题，及时解决。D）到预定干燥时间，抽样准确测定种子水分，测定方法按“中华人民共和国农作物种子检验规程”或“国际种子检验规程”进行。测定结果及时记在本上。若种子含水符合入库标准，要尽快在干燥条件下包装，若不符标准，继续干燥直到合格。因种子大小、种皮组分、薄厚不同，各作物种子所需达到入库标准含水量的时间也不同，见表15－4。

表11－4　　几种主要淀粉型种子的干燥时间

作物种子	干燥前含水量（%）	干燥时间（小时）	装种用具	含水量<7%天数	设备日烘干能力（份）
		24　48　72　96			
水稻	10.4	7.5　6.6	尼龙袋	2	1080
小麦	9.2	7.9　7.2　6.1	尼龙袋	3	720
大麦	8.6	7.8　6.7　6.2	尼龙袋	2～3	720
高粱	13.4	7.2　6.7　6.2	尼龙袋	2～3	720
谷子	9.2	5.5	尼龙袋	1	2160
荞麦	11.1	7.9　6.4　5.8	尼龙袋	2	1080
黍稷	10.9	7.0　5.7	尼龙袋	2	1080
玉米	9.1	8.1　7.3　7.0　6.4	尼龙袋	4	540

在干燥系统调试中，装种用具为铁丝筛子和网眼尼龙袋两种，用铁丝筛子装种子比尼龙袋干燥效果好，但在箱内占空间大，往外倒种也不便，一般以尼龙袋装种。设备日烘干能力是由15个种子烘干箱一次所能摆放的装种子尼龙袋算出来的。每箱分四层，可摆放144个袋子，15个箱子一次可摆放2160个袋子（份）。如一

天出箱，即为 2160 份，2 天出箱为 1080 份，3 天出箱为 720 份，4 天出箱为 540 份。

② 蛋白质型和脂肪型种子：主要有大豆、花生、棉花、向日葵、苏子、大麻、亚麻、黄麻、油菜、芝麻、红花等。这类种子脂肪含量在 35%～53%，脂肪疏水，种子含水量较低，干燥前原始含水量就在 4%～10%之间。经水分测定，小于 7%即可直接包装；如高于入库要求，可在温度为 20～25℃、RH 为 20%～30%的干燥间敞口干燥，长则 7 天，短则 2 天，这类种子的含水量就可达到入库要求。因此，一般不入箱加温干燥。

③ 食用豆类：主要有蚕豆、豌豆、红小豆、绿豆、菜豆等。干燥前原始含水量一般在 9%～13%，因粒大、皮厚、质地紧密而不易干燥。一般先在干燥间预干数日，再装入 30～35℃的干燥箱进行干燥，3～7 天就可达到入库含水量标准。

④ 其他作物：如甜菜、烟草、牧草、绿肥、西瓜、甜瓜、籽粒苋、苘蒿等，先测原始含水量，符合入库标准者，直接包装入库。如需干燥，可在干燥间内或干燥箱内（30～38℃）干燥到水分含量符合入库标准，包装入库。种子含水量计算公式如下：

A）重量计算法：

$$\text{最后含水量}(\%)=100-\frac{\text{最初重量}\times(100-\text{最初含水量})}{\text{最后重量}}$$

B）105℃8 小时一次烘干法：

$$\text{水分}(\%)=\frac{\text{试样烘前重}-\text{试样烘后重}}{\text{试样烘前重}}\times 100$$

C）高水分种子两次烘干法：

$$\text{水分}(\%)=\frac{W_1\times W_2-W_1\times W_3}{W\times W_2}$$

此式可简化为

$$\text{水分}(\%)=100-W_1\times W_3$$

式中，W 为 20g 整粒试样重量；W_1 为 20g 整粒试样预烘后重量；W_2 为 5g 磨碎试样重量；W_3 为 5g 磨碎试样烘后重量。

（2）种子包装　为了使干燥后的种子含水量保持不变，必须

将干燥后的种子密封包装，只有这样才能达到低温干燥长期保存种质资源的目的。任何具有防水性而对种子无害的材料均可用作种子包装材料，如玻璃、金属和铝箔等材料。我国国家种质库和青海国家复份种质库目前采用三种材质的包装容器，即 ZH_{12} 型螺旋盖式马口铁种子盒、LF_{2Y} 防锈铝种子盒和铝箔袋。马口铁种子盒由 0.3mm 厚的马口铁板冲压成形，外表面涂防锈漆。外径 60mm，高 42mm，内容积约 118cm^3，每盒可装种子 80～100g。盒盖内有塑料胶密封圈，装种后靠螺纹旋紧达到完全密封。LF_{2Y} 防锈铝种子盒，用于复份种质的包装，盒的外径、高、内容积同 ZH_{12} 马口铁种子盒。复合铝箔袋由三种不同的材料合制而成。外层是聚酯，起保护铝箔防机械损伤和氧化作用；中层是铝箔，起隔绝水分作用；内层是聚乙烯，作用是使铝袋遇热能够密封。上述两种种子盒仅适合包装中小粒种子，对大粒种子就要用铝箔袋了。铝箔袋有大小两种，小袋 20cm×15cm，用于装中大粒种子；大袋 20cm×30cm，用于特大粒种子的包装。

种子包装的程序包括：①盒、袋准备，包括擦盒（因加工时盒内有碎屑和机油）、贴号。②包装，依序对号装种，随时核对号码，不得张冠李戴。马口铁盒，随装随拧紧；防锈铝种子盒，随装随封口；铝箔袋也是随装随封，尽量缩短种子包装时间，防止过多吸湿。虽然包装环境的温、湿度有控制（温度 20～25℃，相对湿度 35%～42%），但经干燥的种子仍然会少量吸湿。③称重，包装后的每份种子都要称重（种子净重），以克为单位，取小数点后一位。数据记在种子清单上，并输入计算机。④ 移交，包装完的种子和有关资料要移交给库管人员，由他们负责入库。种子干燥包装的工作流程见图 11－2。

（七）种子入库定位

种子包装称重后，由管理组人员及时把种子装筐送入冷库定位存放。库管人员应预先把库内种子架按列、档、筐顺序进行编号，叫库位号。国家种质库由 2 个等大的长期库和 4 个等同的可调库组成。每个长期库均有24列种子架。2个固定架，11个活动

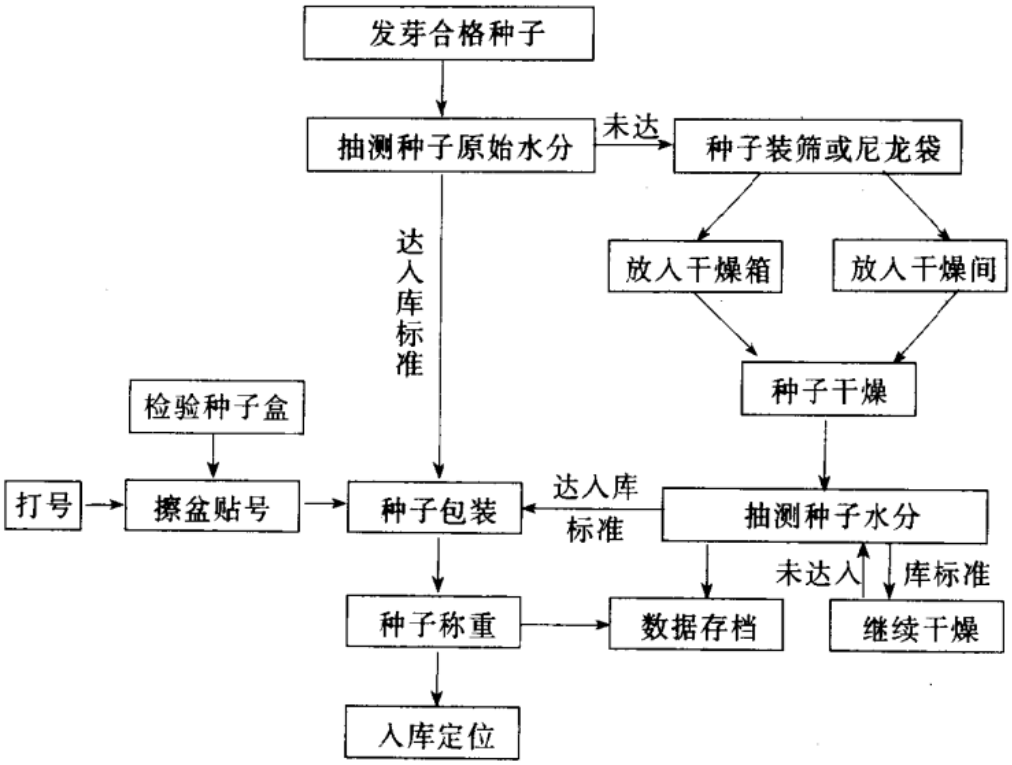


图 11－2　国家种质库种子干燥包装流程(引自胡承莲:种子干燥)

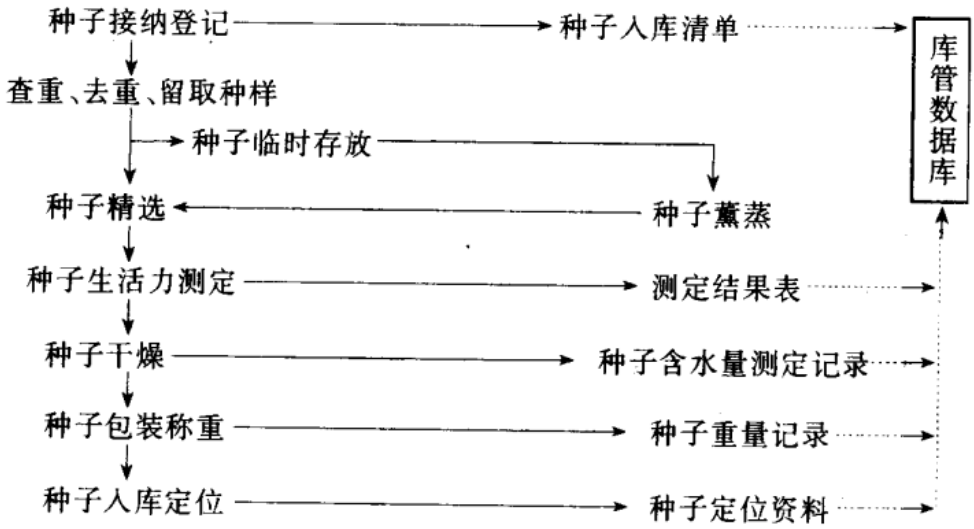


图 11－3　种子贮存程序

架(每个由2列组成)。每列又分10档,每档又可放40个种子筐,每筐可放90个种子盒。如此大的容量,必须有合乎逻辑的库位编号才能使种子存取方便。如 LW_{120635},表示该种子筐在西边长期库第12列种子架的第6档的第35筐。种子入库时按序摆入种子筐,在一张卡片纸上写上库位号和种子分类编码号,将卡片纸立在筐边。依库位号把种子筐就位,入库即告终止。种子贮存的程序如图11-3所示。

二、作物种质低温保存技术

(一)低温库设计及制冷技术

作物种质低温贮存库的大小和温、湿度指标,以及配套附属用房的面积、条件由低温库使用单位根据种质贮存量大小向设计单位提出,设计单位必须精心设计和计算。现阶段普遍存在的一个问题是低温库建得起但用不起,主要是它消耗能源(主要是电力)太多,运行费用昂贵。因此,节能型的低温库设计就成为设计者应重点考虑的问题,关键是把低温库的隔汽层和保温层设计好。

(1)隔汽层设计　任何低温库,只要投入运行,库内外就会有很大温差。以国家库为例,库内-18℃,库外盛夏温度30℃以上,内外温差50℃左右。如果没有良好的隔汽层,大量水汽就会渗透到库内,保温材料受潮,保温性能恶化。内外热量交换加大,势必多耗能源。好的隔汽层材料有两种,一种是铝箔,0.08~0.1mm厚,蒸汽渗透阻为3700$(m^2 \cdot mmHg \cdot h)/g$。另一种是三毡四油,它的蒸汽渗透阻只有32.9$(m^2 \cdot mmHg \cdot h)/g$。所以隔汽材料应首选铝箔。同时在设计时,要注意屋顶、四壁、地面的隔汽层要连为一体。

(2)保温层设计　保温层是减少外界向种质库内传递热量的主要屏障。从节能的观点出发,应选导热系数最小的保温材料,并增加保温层的厚度。虽然初次投资大点,但从长期运行能耗来看要合算得多。

外界通过围护结构传入库内的热量 $Q = KF$。

式中,F—库的围护结构表面积(m^2);

K—围护结构的经济传热系数[$kW/(m^2 \cdot h \cdot ℃)$]。

现借用空气调节的公式，分析影响经济传热系数的因素，

$$K=\sqrt{\frac{\lambda y}{(t_{wp}+\frac{J_{\rho_p}}{a_w}-t_n)(M_1+Z_1\beta\eta J_d}}$$

式中，K—围护结构的经济传热系数[kW/(m²·h·℃)]；

λ—保温材料的导热系数[kW/(m²·h·℃)]；

y—保温材料价格(元/m³)；

M_1—通过围护结构每小时传入 1kW 热量所需要的初次投资费。[(元/(D·kW·h)]；

Z—保温材料初投资回收年限(y)；

t—库内计算温度(℃)；

t_{wp}—当地夏季室外计算温度(℃)；

J_ρ—太阳总辐射强度的昼夜平均值[kW/(m²·h)]；

ρ—围护结构外表面太阳辐射热吸收系数；

α_w—围护结构外表面换热系数[kW/(m²·h·℃)]；

β—冷冻机、水泵、风机、散热塔的耗电量与制冷量的比值[(kW·h)/J]；

η—冷冻机、水泵、风机、散热塔的年工作时间(h/y)；

J_d—电价[元/(kW·h)]。

从上式可以得出：①尽量选择价廉质优的保温材料，λ 与 y 的乘积最小，K 值便小，可省初投资和耗电量。②库址选在夏季室外计算温度低、太阳辐射强度小的地方。在库的平面布局上，尽可能使冷库库体处于其它辅助房间的包围之中，如有暴露于外界的墙面，要注意选择吸热小的墙面材料。③在冷冻设备、电价和保温材料的考虑上，应增加保温层的厚度，初投资虽高，但可降低冷冻设备的耗电量，从长远看十分合算。

(二) 种质库种子分类管理技术

国家种质库目前保存的各类农作物种质资源，总数已达 30 多万份，它们分属 30 科、174 属、600 个种(含亚种)。国家库种子分

类管理技术分三级。第一级，将作物分成3个大类，Ⅰ代表农作物，Ⅱ代表蔬菜，Ⅲ代表绿肥和牧草。第二级，再将各大类作物分成若干小类，以1、2、3、4…编码，分别代表农作物大类中的禾谷类、豆类、纤维类、油料类……，或者蔬菜大类中的根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类……。第三级，以A、B、C、D…编码，分别代表每一小类中的某一作物。如I_1A代表水稻，I_1B代表小麦，I_1C代表黑麦，I_1D代表小黑麦。A、B、C、D后的数字则是某一作物的某个品种，如I_1A0001代表水稻某个品种，I_1B0001代表小麦某个品种，I_1D0001代表小黑麦某个品种，$Ⅱ_1A0001$代表萝卜某个品种。依次类推，便可编排出所有作物种子的类别和号码。国家种质库农作物大类和蔬菜大类编码见表11－5。

表11－5　　国家种质库作物分类编码一览表

Ⅰ农作物大类

	1.禾谷类	2.豆类	3.纤维类	4.油料类	5.烟草	6.糖类
A	水稻	大豆	棉花	花生		甜菜
B	小麦	野生大豆	亚麻	油菜		甜菊
C	黑麦	豇豆	苎麻	芝麻		
D	小黑麦	豌豆	苘麻	苏子		
E	大麦	绿豆	大麻	红花		
F	燕麦	小豆	红麻	向日葵		
G	玉米	饭豆	黄麻	蓖麻		
H	高粱	小扁豆				
I	谷子	黑吉豆				
J	黍稷	木豆				
K	稗掺	普通菜豆				
L	薏苡	多花菜豆				
M	荞麦	蚕豆				
N		鹰嘴豆				
O		刀豆				
P		利马豆				
Q		扁豆				
R		藜豆				
S		四棱豆				

Ⅱ蔬菜大类(一)

	1.根菜类	2.白菜类	3.芥菜类	4.甘蓝类	5.瓜类	6.茄果类
A	萝卜	结球白菜	叶用芥菜	结球甘蓝	黄瓜	蕃茄
B	胡萝卜	不结球白菜	茎用芥菜	球茎甘蓝	南瓜	茄子
C	芜菁	苔菜	根用芥菜	花椰菜	冬瓜	甜辣椒
D	芜菁甘蓝	菜苔	苔用芥菜	嫩茎长椰菜	节瓜	酸浆
E	根用菜		籽用芥菜	芥蓝	苦瓜	
F	辣根			邹叶甘蓝	丝瓜	
G	美国防风			红叶甘蓝	瓠瓜	
H	牛蒡			抱子甘蓝	蛇瓜	
I					菜瓜	
J					越瓜	
K					佛手瓜	
L					黑子南瓜	
M					西瓜	
O					甜瓜	

Ⅱ蔬菜大类 (二)

	7.豆类	8.葱蒜类	9.绿叶菜类	10.薯芋类	11.水生蔬菜类	12.多年生类及杂类
A	菜豆	韭菜	菠菜	豆薯	藕	香椿
B	莱豆	大葱	芹菜	山药	茭白	苟杞
C	多花菜豆	分葱	苋菜	马铃薯	菱	黄花菜
D	刀豆	洋葱	蕹菜	芋	慈茹	石刁柏
E	豇豆	韭葱	叶用莴苣	姜	荸荠	竹笋
F	毛豆	蒜	茎用莴苣	菊芋	莼菜	百合
G	豌豆	薤	茴香	磨芋	水芹	草石蚕
H	蚕豆	其他	芫荽	葛	蒲菜	银条
I	扁豆		叶用菜	蕉藕	豆瓣菜	襄荷
J	四棱豆		落葵		芡实	发菜
	其他		茼蒿			蕨菜
L			荠菜			其他
M			冬寒菜			
N			荆芥			
O			金花菜			
P			其它			
Q			紫苏			

（三）种子活力测定技术

测定种子活力的方法，按其性质、特点分为生理测定、生化测定、物理测定等三大类。其中幼苗生长和评价法、砖砾法、抗冷测定法、电导法、加速老化法、控制变质法、TZ 染色法和 TZ 糊粉层染色法等 8 种方法已于 1981 年列入《种子活力测定法手册》。下面重点介绍其中几种。

(1) 幼苗生长和评价法　它主要利用幼苗的性状表现来评定种子的活力。主要用以下三种指标进行评价。

① 幼苗分级法：以刚发育幼苗表现的性状来判断活力高低。发芽条件按常规要求之外，还需直立或斜板发芽的装置，以便于观察幼根与幼芽的性状并测量其长度。分级标准可参照表 11－6。

表 11－6　　幼苗分级记载表

正常苗			畸形苗				腐烂苗	硬实或副眼不发芽的种子
健苗 (%)	弱苗 (%)	总数 (%)	Ⅰ级 (%)	Ⅱ级 (%)	Ⅲ级 (%)	总数 (%)	(%)	(%)

② 幼苗(根)生长速率：生长势强的幼苗多表现出幼苗或幼根生长迅速，且与田间出苗率趋势相一致。本方法主要测量幼苗或幼根在规定时间内的平均长度(也可用干、鲜重)，以平均长度(或重量)标志活力水平。

③ 贮藏物质消耗率与运转率：根据种子萌发时胚乳或子叶中的物质一部分转化用于建造新组织、新器官，同时一部分用于呼吸消耗。这一过程的强弱也是活力高低的标志。物质消耗率用贮藏用尽法测定。方法是将种子放在黑暗中发芽 14 天，测定重量，按下式计算结果：

$$\frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

式中，W_1 为种子(对照)烘干重；W_2 为发芽后种子烘干重。物质消耗率高，种子活力高。

物质转运率是将种子放在黑暗中发芽 10 天，测苗干重与贮藏

组织(子叶或胚乳)的干重,按下式计算:

$$\frac{S_1}{S_2}\times 100$$

式中,S_1 为苗重;S_2 为子叶(或胚乳)的干重。物质转运率高,种子活力高。

(2) 抗冷测定法　此法主要用于玉米、大豆、豌豆等作物,具体操作是,将种子插入砂与土按 1∶1 混合的土壤中,使土壤持水 70%,并定量装入一定规格的塑料盒中(7cm × 10cm × 4cm 或 30cm×40cm×20cm),覆土厚度及种子播种距离应一致,然后置于 10℃、相对湿度 95%的条件下,放置 7 天后转入适温条件下促其出苗。经 1～2 周特定期限统计出苗率,按出苗率及幼苗高度来判断种子活力高低。

(3) 砖砾法　此法应用于各种禾谷类作物、大粒豆类、菠菜、芥菜、甜菜、胡萝卜、棉花、花生及三叶草等牧草种子。其方法是砖灰消毒后装入 9cm × 9cm × 4.5cm 的方形塑料盒中,浸湿后播上 100 粒种子,覆 3cm 厚的砖灰,最终每盒应有 550g 砖灰和 125ml 水。然后放在 10℃下 10～14 天,苗出砖灰后打开盖子,按预定期限评定幼苗质量,从而判定种子活力高低。

(4) 加速老化法　此法目前应用广泛。其方法是用高温高湿加速种子的老化劣变过程,与正常的自然条件下的劣变过程相似,只是老化劣变的速度大大加快。经加速老化处理后,仍能保持较高发芽率的种子,说明活力高,耐贮力强;反之则表明种子活力低,耐贮力差。加速老化的温度为 40～45℃,相对湿度为 100%。温度、湿度及处理时间的长短应视种子的种类而定。紫苜蓿等 17 种作物加速老化的温度、时间对应组合见表 11－7。老化试验结束后检定老化效果,以常规发芽方法测定发芽率,结合幼苗生长速率、幼苗分级法等判断种子老化程度和抗老化能力,确定种子活力强弱。

(5) 电导法　种子老化劣变,细胞膜受损,透性增大,导致种子浸水时细胞内含物大量外渗。渗出物为电解质,渗出物越多,电

导率越高，而种子活力与电导率呈负相关，即电导率高的种子活力低。电导仪种类繁多，性能较可靠的有：DDS—ⅡA 型（上海），ASA—610 型（美国），ACAS—1000 型（美国），ZYZH88 型（北京）等。电导仪操作简便，但每次测试前定要用无离子水将电极冲洗干净，并随时校正仪器，防止测试偏差。要严格控制浸种温度和时间，浸种要用无离子水。

表 11－7　　17 种作物加速老化的温度、时间组合

作　物	加速老化试验		缓慢老化试验
	相对湿度 100% 时的温度（℃）	处理时间（h）	处理温度 30℃ 相对湿度 75%（w）
紫苜蓿	42	84，72	6
菜　豆	42	84，72	20
雀　麦	45	72	9
玉　米	42	84，96	24
绛三叶	40	72	9
羊　草	42	84	15
铁扫帚	40	72	6
莴　苣	40	72	9
洋　葱	42	72	6
萝　卜	45	48	24
红三叶	40	72	9
高　粱	45	72	12
大　豆	40	72	9
牧　草	42	60	6
西　瓜	45	144	21
小　麦	45	48	18
陆地棉	42	72，96	－

＊此表引自崔聪淑：低温保存原理。

（6）TZ 染色法　是目前国际通用的快速测定种子活力的方法。TZ 是“Tetrazolium”的缩写。全名应是 2，3，5－triphenyl tetrazolium chloride，简称 TTC，中文叫 2，3，5－氯化三苯基四氮唑，

分子式是$C_{19}H_{15}N_4Cl$,系黄白色粉末,感光性强,须用棕色瓶装,存放暗处。它还原后呈红色,又称红四唑。测定原理是:活种子的胚细胞含有脱氢酶,无色透明的TZ盐药液被种子吸收后便参与胚部活细胞的还原过程,从脱氢酶接受氢离子,使TZ经氢化还原,使活细胞染成红色。根据是否染色及染色部位区分种子有无活力。此法原理可靠、方法简便、直观快速、结果准确、应用广泛。但要求测试人员有专门知识、熟练操作技能和科学判断能力。测定的程序和方法是:

① 药液配制:常用药液浓度为0.1%～1%,0.1%适用于切开的种子,1%适用于整粒种子和林木种子。药液pH值在6.5～7.5之间。1%以上的高浓度药液需用磷酸缓冲液配制,以利溶解和着色。

② 试样数粒:中小粒种子数为100粒×2,大粒种子数为50粒×2。

③ 试样前处理和药液浸种(染色):为使种子加速吸湿,软化种皮,促进酶系统活力,提高染色效果和鉴定准确性,试样要进行前处理,包括吸湿前除去种子外部的附属物、吸湿和切种(有部分小粒种子不需切种)三方面。因不同作物种子特性不同,前处理方法和浸种染色时间也不同。各种作物种子前处理技术规定和染色时间列如表11－8。

④ 观察鉴定:到染色时间,取出种子冲洗干净,在放大镜或体视显微镜下仔细观察种胚着色情况,凡胚的主要机构染成红色的为有活力种子,胚的主要机构之一不染色或染成浅色斑点的为无活力种子。根据此标准算出有活力种子的百分率。

(四)休眠种子的破眠技术

种子休眠分原生休眠和初生休眠两种。种子原生休眠原因,因作物不同而异。禾本科作物常因种皮稃壳的不透性引起休眠。小粒豆科作物种子的休眠种皮不透水性是其致因。种皮果皮上有抑制种子发芽的物质常见于蔬菜中部分十字花科和甜菜种子。休眠原因不同,破眠方法各异。下面介绍几种常用的方法。

表 11－8　各种作物种子 TZ(四唑)染色技术规定(国家标准)

作物种类	吸湿前处理	吸　湿	吸湿后处理	溶液浓度(%)	35℃染色时间(h)
水稻	剥去颖壳	清水浸种 12 小时	纵切	0.1	1～2
小麦	－	30℃中浸种 3～4 小时或放于湿毛巾或纸发芽床 1 昼夜	纵切	0.1	0.5～1
大麦	－		纵切	0.1	0.5～1
黑麦	－		纵切	0.1	0.5～1
燕麦	－		纵切	0.1	0.5～1
玉米	－		纵切	0.1	0.5～1
高粱	－		纵切	0.1	0.5～1
粟	－		纵切	0.1	2～3
黍(稷)	－		纵切	0.1	2～3
荞麦	－		剥去果皮	0.1	2～3
大豆	－	于两层潮湿纸、巾间吸湿	剥去果皮	1.0	3～4
豌豆	－		剥去种皮	0.5	3～4
菜豆	－		剥去种皮	1.0	3～4
豇豆	－		剥去种皮	1.0	3～4
花生	剥去夹壳		剥去种皮	1.0	3～4
油菜	－	30℃中浸种 3～4 小时或放于湿毛巾或纸发芽床 1 昼夜	剥去种皮	1.0	3～4
芝麻	－		剥去种皮	1.0	3～4
向日葵	剥去果皮		剥去果皮	1.0	3～4
棉花	剥去外种皮		剥去种皮	0.5	2～3
红麻	－		剥去种皮	1.0	1～2
大麻	－		剥去种皮	1.0	3～4
蓖麻	－		剥去种皮	1.0	2～3
甜菜	－		剥去种皮	1.0	3～4

(1) 高温破眠　有的作物种子有后熟阶段，后熟阶段不结束，其种子便不发芽。利用高温处理种子，可促进其后熟阶段的结束。例如，水稻种子，温度 27℃，50% 的种子解除休眠要 50 天；37℃ 时，只要 15 天；47℃ 时，仅用 5 天。

(2) 低温破眠　大多数非热带作物种子，可在 1～10℃ 的低温条件下解除休眠。实验证明，低温对胚、种皮引起的休眠以及原生休眠、次生休眠都有一定效果。国家种质库对 2000 余份不同休眠程度的谷子进行低温(5～7℃)处理 3 天，种子发芽率大大提高，说明低温破眠效果显著。大多数草本植物种子均可采用低温破眠方法。

(3) 变温破眠　变温是被广泛应用的、十分有效的破眠方法。变温可在一天内以小时计算，如 20℃、16 小时，30℃、8 小时，每天如此，连续几天；也可隔日变温处理，如今日 20℃，明日 30℃。一般经过 2～3 个周期，便可达到解除休眠的目的。

(4) 光照破眠　光对种子解除休眠影响很大。不同种子要用不同光强度照射，光照周期长短也因品种不同而异。光照破眠机理目前尚不十分清楚，通过光照增加种皮透性、改变种皮内发芽抑制物质的性质可能是光照破眠的主要原因。

(5) 化学药剂破眠　用于破除种子休眠的化学物质很多，常用的有赤霉毒、细胞分裂素和乙烯三种。双氧水、乙醇、次氯酸钠、硫脲、硝酸盐、亚硝酸盐、氢离子、氰化物等，在不同低温、光照条件下，对各种种子破眠也有着不同的作用。有些种子的果皮坚硬，应用硫酸、石灰、H_2O_2 和 NaOH 等软化果皮，也可促进种子有效发芽。

另外，对一些种皮不透气不透水的种子，用器械、人工破损种皮，增加透性也是促进种子发芽的常用方法。不少豆科作物种子的种皮，如豌豆、豇豆、小豆等，种皮光滑坚实，不透水气，阻碍种子吸湿萌动，部分破损其种皮，就可以得到较满意的发芽效果。

§11.4 作物种质资源低温保存的发展趋势

一、种子的超干贮存

目前世界信息和预警系统数据库中记录了共有1308个基因库,全球非原生境种质库中贮存了大约610万份收集品。但是,多数国家没有长期非原生境贮存设施,能对收集品进行安全、长期管理的国家可能不到一半,就连俄罗斯和12个国际基因库、区域基因库也无安全的长期保存设施。

1985年,国际植物遗传资源委员会首先提出对某些作物种子采用超干贮存的设想,并作为重点资助的研究项目。1986年,英国里丁大学首先开始种子超干研究。从80年代后期开始,中国的浙江农业大学、北京植物园、中国农科院国家种质库也相继开展了种子超干研究并取得一些研究结果:

① 多数正常型作物种子可以进行超干燥贮存,但不同类型的种子耐干程度不同。脂肪类作物种子具有较强的耐干性,可以进行超干燥贮存。淀粉类和蛋白类作物种子耐干程度差异较大,有待进行深入研究。

② 种子超干不是越干越好,存在一个超干水分临界值。当种子水分低于临界值,种子寿命不再延长,并出现干燥损伤。不同作物种子水分的超干临界值不同,需逐个进行试验。从80年代后期开始,已经研究出的不同作物种子超干含水量临界值列如表11-9。

③ 种子的干燥速率因干燥剂的种类和剂量不同而不同。种子在P_2O_5、CaO、$CaCl_2$和硅胶中的干燥速率依次递减,在P_2O_5中最快,在硅胶中最慢。干燥速率对种子活力的影响尚有不同看法,有待深入研究。

种子超干贮存是将种子含水量降至5%以下后密封,置于常温或适当低温条件下的贮存。Ellis(1986)将芝麻种子的水分从5%降到2%,在20℃下种子的寿命延长了40倍,并证明种子含水量5%、贮存温度-20℃与含水量2%、贮存温度20℃种子寿命相

同。从而可看出，超干贮存可以大大降低制冷费用，节省能耗，有很大的经济意义和潜在的实用价值，是一种颇具广阔应用前景的种子贮存方法。

表 11－9　　不同作物种子超干含水量临界值

作物种子	临界含水量(%)	资料来源	作物种子	临界含水量(%)	资料来源
粳　稻	4.4	Ellis(1992)	西　瓜	1.25	李志仙(1993)
籼　稻	4.3	Ellis(1992)	南　瓜	2.46	李志仙(1993)
爪哇稻	4.5	Ellis(1992)	冬　瓜	1.74	李志仙(1993)
白芝麻	2.0	Ellis(1986)	花　生	2.0	IBPGR(1990)
甘蓝油菜	3.0	Ellis(1986)	大　豆	6.9	支巨根(1991)
油　菜	2.0	Ellis(1986)	大白菜	1.6	程红焱(1991)
豇　豆	3.3	Ellis(1986)	萝　卜	0.6	周祥胜(1991)
向日葵	2.04	Ellis(1986)	黑芝麻	0.6	周祥胜(1991)
亚　麻	2.7	Ellis(1986)	甜　椒	1.32	沈镝等(1994)
黄　瓜	1.02	李志仙(1993)	章丘大葱	1.67	沈镝等(1994)

由於种子超干贮存研究时间不长，其操作技术、适用作物、不同作物种子的超干含水量确切临界值，以及干燥损伤、吸胀损伤、遗传稳定性等诸多问题，都有待深入研究，使这一方法尽早付于实际应用。

二、核心种质保存

随着世界各国对植物遗传资源收集保存活动的高度重视，资源保存数量逐年增加。但越来越多的保存材料不仅给管理带来了困难，也给资源利用增加了障碍。为解决这一问题，世界上一些科学家提出了建立核心种质的建议。核心种质的概念是以最少量的资源材料包括一个作物种及其野生近缘种的最大限度的遗传多样性。它应具有整个收集品的代表性，并含有整个收集品中主要的遗传多样性，应具有以下四个特点：

① 核心种质是从现有的种质资源保存材料中选出的数量有限的一部分材料，这些材料能代表所有保存材料的遗传范围，并含

有尽可能多的遗传多样性(Brown,1993)。

② 被选为核心种质的材料要有代表性,它们在生态上和遗传上是相互不同的。核心收集品中的材料不能有重复,材料之间的相似性也要尽可能地小。

③ 核心种质是指一个作物和它的野生近缘种,但在发展核心种质时,要分别处理不同的种,这样在核心种质中才能体现出不同种间生物学以及所含变异的差异。

④ 核心种质不是用来代替原有的种质,而是原有种质中一部分选定的种质。建立核心种质的目的是便于育种家和其他研究人员利用保存的材料。尽管核心种质不能减少原有的种质,但使用者可能因此而减少取得重复样品,从而更有效地找寻保存材料的变异,易于找到所需特性的特殊遗传材料。

建立核心种质可分以下四个步骤:

(1) 资料的收集整理　把整个种质现有的资料全部收集起来,包括现有的基本资料、评价鉴定资料、同工酶及种子蛋白等生化资料。另外,在对资料进行整理时,要确定可用资料并予以综合分析。Brown(1993)建议用分级别的方法,将基本资料、评价鉴定资料按照分类学、地理来源、生态来源、遗传标记和农艺性状资料进行分类。对资料不全或无资料的材料暂缓分类。

(2) 材料分组　根据现有的资料,依材料的相似性将种质材料分组。在遗传上,同组材料比异组材料应更相似。若用分层次的方法,可逐步将种质材料分为更小的小组,一直分到适宜为止。分组的多少取决于原有种质、现有资料的多少及希望最低层次上的差异程度。材料来源地是分组的重要依据,因遗传多样性的形成与地理生境密切相关。然后再依农艺性状资料分组,从而把相似表现型材料分为一组。

(3) 样品选择　从所分各小组中按照一定比例取样。取样比例为 15%或 10%均可,视材料多少而异。按每组材料的对数比例取样也可。总之,不可不考虑组群的大小而从每组里选取同样份数的材料。

(4) 核心种质的管理　按上述步骤选出一套核心种质后，就要解决一些管理问题。以种子形式保存在种质库中的作物，可在数据库做上标记，标明属于核心种质，并表明该种质所代表的小组。需要繁殖时，核心种质要与其它种质资源同步进行，并适当增加繁种量，以保证核心种质有足够的数量用于其它研究和分发。核心种质不需另外建库。对无性繁殖和产生顽拗型种子的作物，其核心种质则要另建离体试管苗保存库和种质圃。核心种质建立之后，就可提供研究和利用。如鉴定不同材料的某一特征特性，开展新的育种项目等。还需要进行评价鉴定，确定核心种质所包含的遗传多样性，还可采用同工酶技术、分子技术、指纹图谱等来测定原收集品的变异是否已包括在建立起来的核心样品中了。利用核心种质后得到的资料要反馈回来。

从 1984 年 Frankel 提出建立核心种质至今仅有 10 多年的时间，对一些问题尚有争议和担心：对大多数作物，因资料不全而难以建立核心种质，又怕核心种质中未能包括某些优良性状，顾虑因建立了核心种质而放松对原有材料的管理而造成资源得而复失。问题、担心、顾虑虽有，但核心种质的研究进展仍然不慢。1989 年，Hemon 等结合西非秋葵的评价鉴定，从 2283 份秋葵中选出 189 份组成了它的核心种质。1994 年，中国农科院油料研究所对我国保存的 4251 份芝麻种质资源开展了核心种质研究，首先按品种类型分为农家品种、改良品种和引进品种 3 个组，然后据我国芝麻生产的生态地区各分为 8 组，总共分成了 24 组。再根据现有的评价鉴定资料的多变量分析分组。继而从每个组里按 20% 的比例预选出大约 800 份材料种于田间，比较农艺性状的遗传多样性，进行同工酶分析，比较多样性。如在农艺性状和同工酶分析上表现出的多样性能代表原来的 4000 多份材料的遗传多样性，再按 50% 的比例从每组预选材料中选出构成核心种质的材料，约占总材料的 10%。除秋葵、芝麻外，世界上一些研究机构还对大麦、水稻、高粱、木薯、咖啡、大豆、小麦特殊遗传材料等作物的核心种质的建立进行了研究。

三、低温贮存中种质遗传完整性研究

遗传完整性是指种质的原始状态保持不变。低温贮存中，随着时间的推移必然发生遗传变异，导致遗传性状改变，直至丧失。如在贮存中发生遗传完整性的丧失，也就失去种质低温贮存的意义，这是绝对不能发生的事故。因此，种质在低温贮存过程中，要不失时机的对种质的遗传完整性进行观察和研究，确保种质资源的长期安全贮藏。

遗传完整性研究表明，贮存时间延长、贮存温度高、水分多都会导致染色体损伤和突变增加；不仅种子生活力丧失可以预测，染色体损伤程度也可以预测；只要种子生活力有一定程度的下降，就会有一定分量的遗传损伤；由种子存活百分率可以预测种子中遗传损伤的分量。近年来，系统地研究植物遗传完整性已成为各国学者日益重视的课题。80 年代，美、英、苏、澳等国学者合作研究了贮藏对种子遗传完整性的影响；贮存过程中染色体畸变和其它突变的出现频率和实质；突变体遗传到下一世代的变化情况；评价种子贮存和繁殖过程中，杂合种子群体内的遗传漂移问题。1987～1989 年，马缘生等对青海自然库中贮存 30 年以上的小麦、贮存 13～20 年的豌豆种子，研究了发芽势、发芽率、活力指数、电导率、根尖染色体出现的异常频率及不同发芽率的酯酶、过氧化物酶等同工酶变化。采用人工老化黑麦、小麦，从染色体、生理生化、生活力等方面系统地研究了种子贮存过程中遗传完整性的变化。

目前的研究主要着重于个体、细胞和生理生化三个水平上，以染色体畸变研究最多。个体水平上的研究有生活力变化；数量性状变异，如株高、穗长、抽穗期、成熟期、穗粒数、千粒重等等，数量性状的研究项目因作物不同而不同；表型形态变异的基因突变，如花粉败育突变、叶绿素突变和株高、产量突变等。细胞水平上的研究有染色体畸变和细胞亚结构的变化。染色体畸变可从畸变种类、频率、环境、变异频率与发芽之间的关系及变异遗传诸方面着手研究。细胞亚结构的变化主要指细胞核、线粒体、质体和核糖体的变化。生理生化的变化主要表现在种子贮藏物质、酶活性和生

物大分子的变化。随贮藏时间的延长，种内淀粉、脂肪和蛋白质等的含量发生变化。因呼吸消耗，碳水化合物含量减少，粗蛋白含量保持不变，蛋白质和脂肪都发生降解。在种子衰老过程中，过氧化物酶、脱氢酶、细胞色素氧化酶等活性下降，超氧歧化酶、酯酶、异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶也呈下降趋势。生物大分子方面的研究涉及作物不多，观测项目为三磷酸腺苷的积累变化和 RNA 及 DNA 合成量与老化的关系等。至于遗传完整性变化的机理仍处在深入探索之中。

种子低温保存过程中遗传完整性的研究属于新的研究课题，为防止遗传漂移和基因丢失，应加强该领域的研究工作。

四、低温贮存中种子活力的跟踪监测

种子生活力监测目前主要采用固定样本法和序列测定法。固定样本法每次需种子 200～400 粒，数目偏大，若贮存材料不多，则不宜采用。序列测定法每次只需 20～40 粒种子，准确性可靠，故 1985 年 IBPGR 把此法推荐为种质库种子生活力监测方法。固定样本法是标准的发芽测定方法。中小粒种子每处理用 100 粒种子，重复四次，计算平均数。大粒种子每处理用 50 粒种子，重复四次，取平均数。此法准确性高，缺点是用种量大。序列测定法采用频率分布原理，需事先确定每种作物的参数，按照设定值和一定的计算公式通过计算确定该种子是继续保存或需要更新还是继续测定。序列测定法测定前就需定 6 个参数：P_0 生活力水平，一般为 0.85；P_1，生活力水平，一般为 0.75；$\alpha=\beta=0.5$，α 和 β 为概率，见图 11－4；n 为每次测定的种子粒数，$n=40$（或 20）；N 为允许用于测定的最大种子粒数，大粒种子如花生等种子为 200 粒，中小粒种子为 400 粒。计算式是：如果 $\alpha=\log_{[(1-\beta)/\alpha]}$，$b=\log_{[(1-\alpha)/\beta]}$，$c=\log(P_0/P_1)$，$d=\log_{[(1-P_1)/(1-P_0)]}$，则

$$Dm=\frac{m\cdot d-a}{c+d},$$

$$Hm=\frac{m\cdot d+b}{c+d}$$

有了上述计算结果，按下列各式做出决断：①如果 $Km\geqslant$

Hm，则继续保存；②若 $Km \leqslant Dm$，则更新；③如 $Dm < Km < Dm$，则继续测定。

H 表示种子生活力高于更新标准或低于更新标准的一种假设值，m 表示所测定的种子总数目，欲继续测定，必须使 $m < N$。若 $m > N$，则用下列公式判断：①若 $Km \geqslant (Dm + Hm)/2$，继续保存；②假如 $Km < (Dm + Hm)/2$，则更新，Km 表示发芽的总粒数。

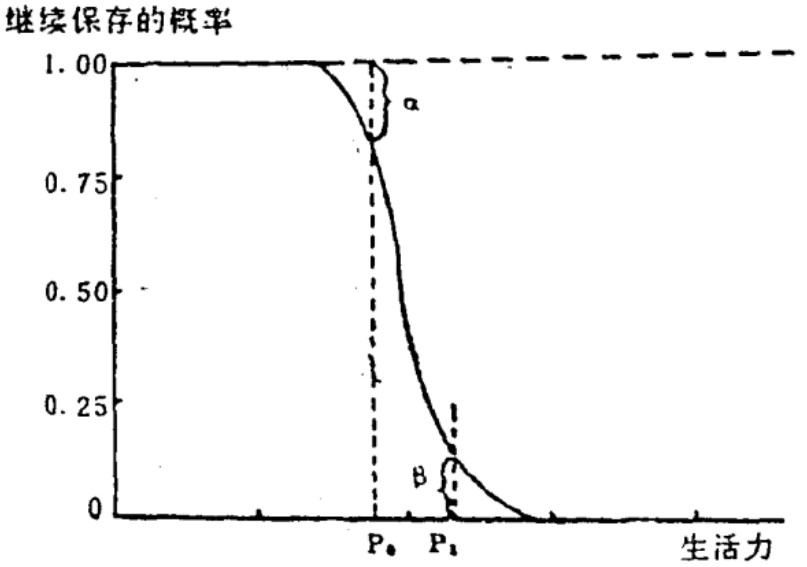


图 11－4　序列测定的参数值

第12章　植物离体材料冻存概述

传统的植物种质库通常表现为以收集种子为主，从种子保存来看，它可分成两类：非顽拗型种子(orthodox seeds)与顽拗型种子(recalcitrant seeds)。其中顽拗型种子含水量高，不能忍受干燥，仅能存活几周或几个月，很难长期保存。另外，有些植物行营养繁殖，不产生种子。可见，种子保存存在着极大的局限性。植物离体材料的超低温保存为种质长期保存开辟了有效的途径。现已证明，植物离体材料经超低温保存后，仍能在适宜的条件下迅速大量繁殖，再生出新的植株，并保持原来的遗传特性。目前已有多种植物离体材料被用于超低温保存研究，且获得极佳的保存效果，见表12－1。

表12－1　　植物离体材料的超低温保存现状

种(Species)	时间(年)	研究者
细胞培养物：		
枫　树　(*A. pseudoplatanus*)	1974	Y. Sugawara
颠　茄　(*A. belladona*)	1975	K. K. Nag
油　菜　(*B. napus*)	1982	L. A. Withers
辣　椒　(*C. annum*)	1977	L. A. Withers
长春花　(*C. roseus*)	1982	K. K. Kartha
毛曼陀罗(*D. innoxia*)	1982	R. H. Hauptmann
曼陀罗　(*D. stramonium*)	1976	Y. P. S. Bajaj
毛地黄　(*D. lanata*)	1982	B. Dietrich
胡萝卜　(*D. carota*)	1973	K. K. Nag
大　豆　(*G. max*)	1976	Y. P. S. Bajaj
大　麦　(*H. vulgare*)	1982	L. A. Withers
天仙子　(*H. muticus*)	1980	L. A. Withers

续表

种(Species)	时间(年)	研究者
苹　果　(*M. domestica*)	1984	J. Dereuddre
烟　草　(*N. plumbaginifolia*)	1983	A. D. Maddox
水　稻　(*O. stiva*)	1982	R. R. Cella
人　参　(*P. ginseng*)	1984	R. G. Butenko
杨　树　(*P. sp.*)	1980	W. D. Binder
花旗松　(*P. menziesii*)	1980	W. D. Binder
红色玫瑰(*R. paul's slarlet*)	1980	L. A. Withers
高　粱　(*S. bicolor*)	1980	L. A. Withers
玉　米　(*Z. mays*)	1979	L. A. Withers
愈伤组织培养物：		
薰衣草(*L. vera*)	1983	K. Watanabe
紫苜蓿(*M. sativa*)	1980	B. J. Finkle
水　稻(*O. sativa*)	1994	田永中、郑从义等
野生稻(*O. rufipogon*)	1996	殷晓辉、郑从义等
人刺葵(*P. dactylifera*)	1980	B. J. Finkle
杨　树(*P. sp*)	1973	A. Sakai
甘　蔗(*S. sp*)	1979	J. M. Ulrich
小　麦(*T. aestivum*)	1985	T. H. H. Chen
美洲榆(*U. americana*)	1984	J. M. Ulrich
原生质体：		
无芒雀麦(*B. inermis*)	1978	R. A. Mazur
毛曼陀罗(*D. innoxia*)	1982	R. H. Hauptmann
胡萝卜　(*D. carota*)	1978	R. A. Mazur
大　豆　(*G. max*)	1982	M. Takeuchi
大　麦　(*H. vulgare*)	1974	Y. Sugawara
水　稻　(*O. sativa*)	1988	唐定台等
小　麦　(*T. aestivum*)	1974	Y. Sugawara
玉　米　(*Z. mays*)	1980	L. A. Withers
玉　米　(*Z. mays*)	1990	张士波等
分生组织/芽尖：		

续表

种(Species)	时间(年)	研究者
落花生 (*A. hypogea*)	1979	Y. P. S. Bajaj
油 菜 (*B. napus*)	1984	E. E. Benson
鹰嘴豆 (*C. arietinum*)	1978	K. K. Kartha
麝香石竹(*D. caryophyllus*)	1976	M. Seibert
草 莓 (*F. ananassa*)	1978	A. Sakai
蕃 茄 (*L. esculentum*)	1978	B. W. W. Grout
苹 果 (*M. domestica*)	1978	A. Sakai
木 薯 (*M. esculenta*)	1977	Y. P. S. Bajaj
碗 豆 (*P. sativum*)	1979	K. K. Kartha
马铃薯 (*S. tuberosum*)	1981	L. E. Towill
器官、胚、花粉：		
油 菜(*B. napus*)	1993	梁立、郑从义等
紫菜苔(*B. campestris*)	1993	梁立、郑从义等
百 合(*L. davidii*)	1995	陈钟颖等
胡萝卜(*D. carota*)	1991	J. Dereuddre

§12.1 影响植物离体材料冻存效果的主要因素

一、冻存材料的基本特性

冻存材料的基本特性包括植物的基因型、抗冻性及器官、组织和细胞的年龄等。不同基因型的植物离体材料对超低温冻存的反应各不相同，冻后存活率的显著差异不仅存在于种间，而且存在于同种的不同品系间。因此，保存不同的植物离体材料，需要采用相应的技术方法。

植物细胞培养物的生长年龄是决定冻后细胞存活率的最重要因素之一。因为植物抗冻性的提高与细胞的分裂和生长活动等各种生命活动有密切关系。Nag 和 Street 发现，高细胞质、无液泡、壁薄的小分生细胞冻后的存活率明显高于含大量液泡的大细胞，取延滞生长后期或指数生长期的细胞培养物用于冻存，通常能获

得较高的存活率。此外,冻后细胞的恢复生长依赖于保持分裂能力的细胞浓度,即高密度的活性细胞是细胞冻后生活力稳定的重要指标。细胞体积大小本身对冻存效果也有不同程度的影响,体积过大或过小均直接影响冻存效果。

决定植物器官、胚及花粉冻存生活力的因素主要是温度和含水量。适度干燥的花粉结合超低温保存可望成为一种永久性保存植物花粉的手段。迄今进行花粉超低温保存的植物已达30多种,花粉的有效保存,能解决杂交亲本的花期不育和异地植物杂交上的困难。近几年,由于冻存技术的更新,器官、体细胞胚、合子胚冻存成功的报道已日渐增多,植物种质保存已上了一个新台阶。

二、冻存材料的生理状况

预处理对于调整植物离体材料的生理状况非常有效。通过预处理的植物材料,增加了细胞分裂与分化的同步性,减少了细胞内自由水的含量,使细胞的抗冻力大大提高,奠定了冻后保持较高生活力的基础。

对于植物离体培养物,常在冻存前进行不同程度的预处理以提高抗冻力,处理包括增加培养基中的糖浓度、提高渗透压、减少细胞内自由水的含量,或者在预培养基中加入诱导抗寒力的物质或冻存保护剂,如脱落酸、山梨醇、脯氨酸及二甲亚砜等。通过提高培养基渗透压的预处理,埃及榕树、大豆及毛地黄等植物离体培养细胞的冻后存活率明显提高。石竹的茎尖在含0.75mol/L蔗糖培养基中预培养后,冻后植株再生率接近100%。唐菖蒲愈伤组织、长春花细胞、碗豆的茎尖分生组织于含5%二甲亚砜的培养基上预培养后,极大地提高了冻后存活率。而白云杉的细胞培养物只有在含0.4mol/L山梨醇的培养基中预培养24小时后,才能得到高浓度的存活细胞用于冻存。Goldner报道,毛地黄的细胞培养物在补加海藻糖的培养基中预培养,不仅冻后存活率高,且细胞开始恢复生长所需的修复时间也缩短。

三、冻存保护剂的合理使用

冻存保护剂的使用能减少超低温保存时冰冻造成对细胞的损

伤。植物离体材料的冻存，必须视材料的不同而选择适宜的冻存保护剂。常用的冻存保护剂有二甲亚砜(DMSO)、甘油、糖和糖醇类物质，某些氨基酸、多肽及聚乙二醇等。

二甲亚砜是一种广泛采用的冻存保护剂，它的作用机理是使液态水开始和终止结冰的温度相应降低，到达细胞内外水蒸汽压平衡所需的时间延长，这种作用与二甲亚砜的浓度成正比。但二甲亚砜是一种毒性物质，增加使用浓度或延长处理时间均有可能引起冻存材料的遗传变异，尤其是在过高的温度时要避免处理时间过长。控制使用浓度为5%～10%，一般能表现出很好的保护效果。

山梨醇在植物离体材料冻存中，已被认为是一种常用的保护剂，与二甲亚砜相比，无毒性，且对植物细胞具有脱水与生理调节的双重功效。当很多植物材料单独使用二甲亚砜冻存效果不佳时，采用山梨醇作为复合保护剂，可有效改善冻存效果。这种设计在于利用非渗透性的保护剂山梨醇降低细胞含水量及冰晶形成速度，使渗透性保护剂二甲亚砜能尽快进入细胞，减少冰冻引起的细胞脱水作用，二者结合达到扬长避短的使用效果。它们的组合使用，使包括玉米、糜子、甜菜及木本植物在内的许多植物离体材料冻后存活率显著提高。

Ulrich 和 Finkle 等在二甲亚砜和葡萄糖的混合液中加入聚乙二醇(PEG6000)，配成 10%二甲亚砜 + 8%葡萄糖 + 10%聚乙二醇复合保护剂系统，使枣椰树愈伤组织的冻后存活率接近 100%。随后，用这种保护剂系统成功地保存了甘蔗、水稻、小麦、大豆、胡萝卜、芦笋、苹果、苜蓿及美国榆等愈伤组织和悬浮细胞培养物。

近年来，Growe 等发现海藻糖能与磷脂相互作用而稳定细胞膜结构，防止冰冻对细胞膜造成的直接损伤，因而它也被用作冰冻保护剂。Bhandal 等用海藻糖作为单一保护剂，成功地保存了胡萝卜、烟草等细胞培养物。另外，植物离体材料的超低温冻存中，选用脯氨酸为冻存保护剂能稳定冻存细胞中的蛋白质结构，冻存保护效应甚佳。现已证明，在玉米、蕃茄、水稻等离体材料冻存中应

用脯氨酸作为保护剂效果尤为明显。

四、冻存降温速率的有效选择

植物离体材料的超低温冻存采用快速、慢速及逐级降温法。对于原生质体、悬浮细胞、愈伤组织和某些植物的茎尖，宜用慢速降温冻存，使细胞内的水分有充足的时间不断流到细胞外结冰，达到良好的脱水效应，避免细胞内结冰。而像花粉、分生组织等组织、器官的冻存，可根据其含水量的多少、组织块的大小，酌情选择降温速率，其目的是使冻存的材料获得最佳的冻后恢复生长能力。

植物离体材料的冻存，最重要的因素是降温速率、预冻温度及其停留时间。Kartha 发现，草莓生长点的降温速率必须严格控制在 $-0.5\sim-1.0$℃/min 范围内，否则冻后存活率明显下降。木薯茎尖保存时，若预冻时温度从 -20℃降到 -40℃，则冻后存活率也将从 91% 下降到 3.3%。此外，在预冻温度下停留一段时间也是十分必要的，它对存活率起着关键性的作用。笔者在研究中发现，于 -10℃下保持 15 分钟和 -40℃下保持 1 小时，能显著提高水稻愈伤组织冻后存活率及其再生植株的能力。

不同生物材料的冻存，降温速率明显不同。就慢速降温而言，其降温速率可以在 $-0.1\sim-5$℃/min 之间变化。植物离体材料的冻存降温速率则以 $-0.5\sim-1.0$℃/min 为佳，时间则视材料的特性而调整，一般控制在 1～2 小时以内，也就是降到 $-30\sim-40$℃的终点温度时，材料就可直接浸泡在液氮中贮存。

五、冻存材料的复苏及后处理

植物离体材料从调整生理状况到冻存过程中的每一个操作都影响冻后存活率，所以研究者总是精心设计，周密安排，以获得预期的冻存效果。相比之下，冻存材料的复苏(或解冻)操作就简单多了，一般采用 37～40℃水浴快速解冻即可。当然，从理论上讲，若冻存材料的解冻温度及时间掌握不好，会不同程度地引起细胞内次生结冰而对细胞造成损伤，故复苏以快速为妥。

植物离体冻存材料在解冻后，应尽可能快地进行后处理，避免保护剂带来的不利影响。通常采用培养液洗涤去除保护剂，接种

到最佳生长条件下让其迅速恢复生长，也可通过活性测定及时监测冻存效果。Withers 等却认为，植物离体材料解冻后的洗涤步骤不宜采用，洗涤反而会引起细胞质壁分离，造成冻后细胞的机械损伤，同时洗涤还会影响存活细胞的比例。已有报道显示，在玉米、白三叶草、甘蔗和长春花中观察到不洗涤能提高存活率，增加正常苗形成的比例。

§12.2 植物离体材料冻存实用方法

选择适合于某种植物材料冻存的技术方法时，综合评估相关技术的特点是极为重要的，除了论证该技术方法的可靠性，考虑其实用性外，还必须比较与该技术相关的各种参数，做到心中有数。在实际工作中，比较稳妥的做法是首先确定使用某种较为成熟的方法，进行必要的预实验，然后根据实验结果，参考新的文献，设计适合于欲冻存的特殊植物种属、组织类型的实验方案。事实上，稳妥的做法并非保守，对于植物材料的冻存而言，此种做法是众多学者所推荐的。因为很多植物种属的细胞、组织、器官乃至胚胎对冷冻特别敏感，易因环境温度的改变而受冻死亡。尤其是植物材料直接浸泡在一定的介质中，pH 值、渗透压的变化均能对细胞造成影响。即使是低温保护剂的浓度差异，某种不利添加因子的存在，都会使细胞产生生理性脱水而死亡，结果直接影响冻存材料的质量。植物材料的超低温冻存增加了多种预培养、预处理程序，使冻存操作更为复杂，冻存方法多种多样，从而增加了选择最佳冻存方法的重要性和必要性。

一、超低温保存的关键设备

（一）冷冻降温设备

冷冻降温仪器是生物材料超低温冻存的重要设备。精良的冷冻降温设备可改善植物材料的冷冻状态，提高冻后的生存力及再生率。故选择适宜的产品、型号极为重要。目前，可供选择的冷冻降温设备有进口和国产两大类：进口降温设备主要有英国 Planer

公司、美国 Cryomed 公司、法国 L'Air Liquide 公司产品，具有设计合理、控温精确、温度选择范围广、自动化程度高、省液氮、体积小、经久耐用等特点。如笔者实验室使用的英国 Planer 公司的程控降温仪的控温范围可从 30～－180℃任意调整，降温范围精确到－0.01℃/min～－30℃/min，升温范围可在 0.01℃/min～10℃/min 之间变动。但进口降温设备价格比较昂贵，通常是国产同类型号价格的 5 倍以上。国产降温设备有上海华东工业大学低温工程研究室、北京军事医学科学院实验仪器厂、天津中国医学科学院血液学研究所的产品。其中上海华东工业大学低温室研制的高精度程控降温仪在国内具有较大的市场占有率，受到用户的好评。该降温仪与国外用电磁阀控制的产品不同，利用液氮自然蒸发在杜瓦颈管部分形成的温度梯度，用步进电机实行降温控制，在液氮耗量和实现极慢速降温两个方面有所突破，产品性能接近或达到国外同类产品的水平。其他国产的同类产品降温精度稍微差一些，但性能还比较稳定，价格也较为合理，能满足一般冻存生物材料的需要。冷冻降温设备的结构、组成大同小异，主要由四个重要部分组成：

(1) 程控降温仪，具有较大的控温范围(30～－150℃/min 任意选择)，而最慢降温指数不得高于 0.1℃/min。

(2) 样品冷冻室(立式或卧式)。

(3) 液氮输入泵。

(4) 液氮容器(30～50L)。

(二) 其他设备与仪器

(1) 长期贮存冷冻样品的液氮容器(30L、50L、100L、250L、500L)，大容量的液氮容器最好配报警系统。

(2) 液氮运输容器(30L、50L、100L)。

(3) 小型液氮罐(3～5L)。

(4) 液氮生产机(选择型号视生产规模大小而定)。

(5) 低温冷冻管(1.8－2.0ml)、样品盒、夹子等。

(6) 安全器具(耐温手套、面罩、液氮分配泵)。

(7) 低温冰箱(－20℃以下)。

(8) 复温水浴箱(控温范围 1.0～100℃)。

二、植物材料超低温冻存的基本技术

(一) 标准的预生长体系

(1) 制备标准的液体或半固体培养基,必要时补加某种糖醇类、氨基酸化合物,如甘露醇、山梨醇、蔗糖、葡萄糖、海藻糖、脯氨酸等,其浓度范围以 0.3～0.5mol/L 为妥。制备后的预生长培养基按常法高压灭菌后备用。

(2) 接种优良的植物材料于预生长培养基中,置于 25～28℃培养 1～5 天。

(3) 适时测定预培养材料的生存率,观察其生长状态。

(4) 选择最佳生长状态的材料用于冻存。

(二) 植物材料冻存前脱水处理

植物组织或细胞的含水量与其致死性有直接的关系,被认为具有种的特异性。对于植物材料的超低温冻存而言,组织细胞的高含水量对冻存不利,故冻存前,不同组织材料有一个脱水处理过程。尽管脱水处理对植物材料的冻存是有利的,但脱水程度也是有限的,必须控制在其耐受脱水程度的范围内。植物材料脱水有四种基本方法可取。

(1) 低温保护剂脱水

① 制备标准化的液体或固体培养基,添加甘露醇、蔗糖、葡萄糖、山梨醇的任意一种,终浓度为 0.5～1.5mol/L,制备成脱水培养基。

② 测定待脱水组织的鲜重,立刻转入脱水培养基中,在适当温度下脱水。

③ 视材料的不同,确定脱水时间,一般采用短的脱水时间(2～24 小时)或长时间脱水(1～7 天)两种方式。

④ 定时取样,测定脱水后组织的重量。

⑤ 按下式计算植物材料的最大水分丧失量与最低含水量,选择低温保护剂预冻脱水的最佳处理程序。

$$失水率(\%)=\frac{材料鲜重-脱水后材料干重}{材料鲜重}\times 100$$

(2) 空气干燥脱水

① 挑选优良的实验材料,测定其鲜重,移至洁净的玻璃平皿或托盘中,将其均匀分散。

② 将脱水材料置于超净工作台上以无菌层流空气间隙干燥脱水;或在一个密闭容器中,以压力蒸汽快速穿透的方式瞬间干燥脱水。

③ 控制脱水时间,以达到最佳脱水效果为止。

④ 测定植物组织材料脱水后的干重,按前面的公式计算百分失水量,确定所选择的最佳脱水方案。

低温保护剂脱水和空气干燥脱水的方法既可单独使用,也可交替结合使用,广泛用于植物的合子胚、体细胞胚、胚轴、节杆枝段和愈伤组织的脱水。

(3) 硅胶干燥脱水　硅胶干燥脱水的操作与空气干燥脱水类似,不同之处在于以硅胶代替层流空气和压力蒸汽,在一种比较缓和的条件下脱水,且时间相对较长。

(4) 包裹脱水处理

① 包裹基质的制备

A) 配制含 3%(*W*/*V*)海藻酸钠的无钙标准培养基(包裹剂)。

B) 配制含 100mmol/L $CaCl_2$ 的标准液体培养基(固化剂)。

② 精选待脱水材料,将其移至一个洁净的三角瓶中,加 25ml 左右的海藻酸钠培养基,缓缓摇动使材料浸泡,注意避免产生过多气泡。

③ 吸取 50ml 100mmol/L 的 $CaCl_2$ 标准培养基到一个圆形三角瓶中备用。

④ 用 5ml 大口吸管吸取于海藻酸钠液中浸泡的材料,并用一滤纸片上轻轻吸去管尖上过量的海藻酸钠液。

⑤ 将吸管插入圆形三角瓶中的 $CaCl_2$ 培养基上方,缓缓下滴

植物材料悬液。此时，材料悬液与 Ca^{2+} 离子接触，形成海藻酸盐固态微球，每个微球里包裹大约 1～3 个材料块。

⑥ 倾去过量的固化基质，取出微球，并使其继续聚合 30 分钟。

⑦ 将包裹后的材料分成多个复份样品，在滤纸上吹干，移到标准的半固体培养基上培养。如脱水在含其他成分的液体培养基中进行，脱水时间为 2～16 小时或 1～5 天不等。然后，从每一处理中间隔取出复份样品接种到半固体培养基中培养。

⑧ 移取剩下的复份样品到玻璃平皿中，置于超净工作台上以无菌层流空气风干 1～4 小时，并间隔接种包裹的材料到标准的半固体培养基中。

⑨ 测定每一处理阶段脱水材料的存活率，选择最佳的脱水程序。

包裹脱水处理与低温保护剂脱水相结合，对植物的芽尖和体积大的组织块脱水比较有效，已成功地用于土豆芽尖的脱水，提高了其冻存后的生存率。

（三）常用的冻存程序

就植物细胞培养物而言，采用 Withers 和 King 的标准方法冻存，通常可以获得理想的效果。而像芽尖一类的材料则不然，它们具有较高的种属特异性，必须视材料来源的不同有所调整。下面列出的降温程序对于大多数材料应是可行的。有时，执拗植物组织培养物的冻存较为困难，应尽可能采用几种不同的程序进行比较，选择最佳的冻存方案，从而抵消由于培养中过长分化带来的影响。当几种冻存程序都不能获得有效的冻存结果，就需要考虑可能存在低温保护剂、预处理因素与降温程序的相互影响问题，只有较好地协调相互间的影响因素，才能达到预期的降温效果。

（1）植物材料冻存的程控降温程序

① 将预处理后的植物材料移置到含有 1ml 低温保护剂(DMSO)的低温冻存管中(2ml)。

② 根据冻存材料的特性，将降温仪的开始温度调整到 0℃ 或 25℃。

③ 设置不同的降温速率，常采用 -5℃/min、-1.0℃/min、-0.5℃/min、-0.25℃/min、-0.1℃/min 的降温速率降到 -30℃或 -40℃。

④ 设置中间转换温度，一般为 0℃、-10℃、-15℃、-20℃、-25℃、-30℃、-40℃。

⑤ 设置不同的保温时间：20 分钟、40 分钟、60 分钟。

⑥ 程序运行结束，将冻存管直接投入液氮贮存。

⑦ 按常规方法解冻，测定冻存材料的生存率。

(2) 植物材料的直接冻存程序

① 将待冻存材料经化学保护剂脱水、无菌层流空气风干脱水或海藻酸盐包裹脱水。

② 将脱水后的材料以干燥状态(无保护剂溶液浸泡)分装冷冻管。

③ 直接投入液氮中贮存。

④ 按常规方法解冻，测定冻后生存率。

三、植物冻存材料的解冻与复活

(1) 从液氮中取出冷冻样品管，立刻投入 37～40℃水浴中快速解冻，以 1 分钟内完全解冻为佳。

(2) 接种冻存材料到标准的半固体培养基中培养。

(3) 用 TTC(测定组织、器官、胚、枝、叶片的活性)或 FDA(测定单细胞、花粉等的活性)方法直接染色，测定冻存材料的相对存活率。

(4) 根据冻存材料的相对存活率和直接培养的生长状况，调整冻存降温程序，以达到冻后最高生存率为标准。

§12.3 植物材料冻存的质量控制方法

任何一种成功的冻存技术都需快速、灵敏的检测方法来评估质量，否则该冻存技术就没有普及推广的意义。下面介绍几种重要的植物材料冻存质量控制方法供选用。

一、荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)活性染色

生活细胞内具有很强的酯酶活性,它们可有效裂解荧光素二乙酸酯,产生黄绿色荧光颗粒;而死细胞则不具有酯酶活性,胞内无任何荧光颗粒存在。通过紫外荧光显微镜观察,可清楚地辨别死、活细胞。其操作步骤是:

(1) 用丙酮配制0.1%(*W*/*V*)FDA贮备液,于4℃贮存。

(2) 使用前加几滴FDA贮备液到10ml液体培养基中,充分混匀,制成应用液。

(3) 取1~2块洁净载玻片,吸取检测材料于载玻片上,加几滴FDA应用液,放置几分钟,使荧光染料充分进入细胞内,轻轻盖上盖玻片。

(4) 将材料置于荧光显微镜下用紫外物镜观察(蓝色滤光片)。

(5) 在暗视野下计数荧光染色细胞,于明视野下计数同一视野中的总细胞数。

(6) 至少重复计数5个视野的细胞数,按下列公式计算生存率:

$$\text{生存率}(\%)=\frac{\text{荧光染色细胞数}}{\text{细胞总数}}\times 100$$

(7) 取重复计数结果的平均值,相对存活率以总冻存细胞群体或未冻存对照细胞群体的活细胞百分数表示。

二、氯化三苯基四唑(TTC)试验

活细胞内的脱氢酶直接还原TCC生成红色甲臜(formazan)产物,该产物于490nm波长处有最大吸收值,用分光光度计可定量测产物的存在,并间接推算活细胞的百分率。该测定方法尤其适用于批量冻存材料的活性测定。

(一) 试剂的配制

(1) 溶解0.6gTTC试剂在0.05mol/L磷酸缓冲液中,配制成0.6%(*W*/*V*)的TTC贮备液。

(2) 95%的乙醇缓冲液(pH7.4)+0.05%(*V*/*V*)的吐温80,

充分混匀，配制成抽提液。

（二）具体方法

（1）加待测植物组织到一支洁净的试管内，滴加 3ml TTC 试剂，于真空状态下渗透 10～20 分钟。

（2）28℃温育过夜

（3）加 7ml 95% 乙醇抽提液，水浴煮沸 4 分钟，抽提有色复合物。

（4）使样品充分混匀，置 500～1000g 条件下离心沉淀细胞碎片。

（5）吸取离心沉淀的上清液，在分光光度计上于 490nm 光波长测定其吸收值。

（6）按下式计算冻存材料的百分存活率：

$$存活率(\%)=\frac{冻后样品的吸收值(490nm)}{冻前样品的吸收值(490nm)}\times 100$$

三、植物材料冻存后 Ca^{2+} 的细胞化学测定方法

Ca^{2+} 在植物体内起着第二信使的作用，它与钙调素相结合，具有接受、传递和放大外界信号，产生各种生理生化反应的功能。正常情况下，Ca^{2+} 主要存在于植物细胞内的液泡中，细胞内胞质中的游离 Ca^{2+} 水平很低。低温冻存的不利因素能造成植物细胞生理性损伤，使细胞质和细胞核中的 Ca^{2+} 浓度显著增加，从而诱发许多不利的生理生化反应，导致细胞内物质代谢失控，引起细胞的生理性死亡。通过细胞化学方法，能比较直观地观察植物细胞内 Ca^{2+} 的分布及水平变化，如测定样品细胞质中 Ca^{2+} 浓度大于正常值，细胞生理性死亡的机会增大。这有利于对冻后的细胞材料进行生理指标评估。王红等人采用测 Ca^{2+} 的细胞化学方法测定了低温协迫下水稻叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化，证明低温（或冷冻）的不利用因素造成植物细胞质和核内的 Ca^{2+} 浓度增加，导致细胞生理性死亡。

（1）试剂的配制

① 2% 焦锑酸钾：100mmol/L 的磷酸缓冲液（pH7.1）100ml，

焦锑酸钾 2.0g,pH 7.6。

② 初固定液(V/V):戊二醛(分析纯)3.0ml,2%焦锑酸钾100ml。

③ 后固定液(V/V):锇酸 1.0ml,2%焦锑酸钾 100ml。

(2) 按常规复活冻存的植物材料,用液体标准培养基洗涤 1~2 次备用。同时制备新鲜材料作对照。

(3) 将待测的材料分别投入现配的初固定液中进行初固定,通常于 4℃固定 3 小时。

(4) 用 2%焦锑酸钾洗涤 3 次,每次约半小时。

(5) 将洗涤后的材料移至后固定液中,于 4℃冰箱内固定过夜。

(6) 固定材料先用双蒸水先涤 4 次,再用 pH10.0 的双蒸水(用 0.1mol/L 的 KOH 调节 pH 值)洗涤 2 次,每次半小时。

(7) 随后,经系列浓度的乙醇溶液依次脱水,丙酮过渡,Epon812包埋,LKB8800 型超薄切片机切片,0.5%的醋酸双氧铀染色。

(8) 于透射电镜下观察照相。

(9) 对照切片的处理,将在电镜下已确定有焦锑酸钙沉淀的定位切片漂浮在 100mmol/L 的 EDTA(pH8.0)溶液中,于 60℃处理 10~60 分钟,使 EDTA 与 Ca^{2+} 螯合,脱去原沉淀中的 Ca^{2+},再置于电镜下观察照相。

四、植物材料抗冻性的测定

植物细胞中线粒体膜的流动性与其抗冻性有比较直接的正相关性,即植物的抗冻性越强,线粒体膜流动性就越强。测定线粒体膜的流动性,为评价植物材料的抗冻性提供了重要的生物物理指标。杨福愉等人采用电子顺磁共振波谱法、荧光偏振度法测定了冷冻水稻线粒体膜的流动性,获得理想的结果。

(一) 电子顺磁共振波谱测定法

(1) 试剂制备

① 自旋标记物:以氯仿为溶剂,制备 0.25mmol/L,5,12,16-

氮氧基硬脂酸的自旋标记物。

② 50mmol/L 的 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液：以双蒸水为溶剂，配制 50mmol/L 的 $K_3Fe(CN)_6$ 溶液。

③ 0.3mmol/L 的甘露醇溶液：以双蒸水为溶剂，配制 0.3mmol/L的甘露醇溶液(pH 7.2)

(2) 测定方法

① 用常法分离待测植物材料中的线粒体，低温贮存备用。

② 于微量玻管中加入 4～6μl 自旋标记物、100μl 重蒸乙醚，真空干燥片刻，迅速加入 10μl$K_3Fe(CN)_6$ 溶液、30μl 贮备线粒体液(约含线粒体蛋白质 300μg)，充分均匀。

③ 缓缓加入甘露醇溶液，使总体积达 0.1ml。

④ 快速搅拌 5 分钟后装入测试样品管，在常温(约 16℃)下用电子顺磁共振波谱仪测定 ESR 波谱值，通过计算公式计算。

(3) 计算公式

$$S = 0.568 \frac{T_{11} - T_{\perp}}{a^1}$$

$$a^1 = \frac{1}{3}(T_{11} + T_{\perp})$$

S 是序参数，为结构参数，反映的是脂质分子取向的平均变化。

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \times W_0 \left[\left(\frac{h_o}{h-1} \right)^{\frac{1}{2}} - 1 \right] (s)$$

τ_c 是旋转相关时间，反映的是分子运动的快慢。

W_o 为中场线峰宽度；h_o 为中场线峰高度；$h-1$ 为高场线峰高度。

S 值及 τ_c 值用来反映线粒体膜脂的流动性，S 值及 τ_c 值越大，膜脂流动性越小，其抗冻性较差；反之，则抗冻性增强。

(二) 荧光偏振度测定法

(1) 用常法制备植物材料的线粒体悬液(约含线粒体蛋白 200μg)备用。

(2) 吸取荧光偏振探针 DPH 的四氢呋喃溶液(2×10^{-3}mol/

L)10μl 于 50ml 小三角瓶中，加入 8ml0.3mol/L 的甘露醇溶液(pH 7.2)、2ml 0.1mol/L Tris－HCl 缓冲液(pH 7.2)。

(3) 吸取上述溶液 2ml，加 20μl 线粒体悬液，置室温充分搅拌 15 分钟，20℃水浴保温 30 分钟。

(4) 于带偏振附件的荧光光度计上进行测定，波长 360nm，同时以未加线粒粒的 DPH 溶液作对照。

(5) 测定结果的计算公式

$$P=\frac{I_{11}-GI_{\perp}}{I_{11}+GI_{\perp}} \qquad G=\frac{I\ 90.00}{I\ 90.90}$$

式中，G 为校正因子；I_{11}和 $I_{\perp}$分别为起偏器光轴垂直放置、捡偏器光轴垂直和水平放置测得的荧光强度。

P 值越大，则反映脂质的有序性越大，流动性越小。P 值越小，则流动性越大，植物的抗冻性越强。

第 13 章　植物离体材料冻存实例

§13.1　植物细胞培养物的冻存

植物细胞培养物的广泛研究，不仅阐明了许多基础理论问题，揭示了很多生命现象，而且在合理使用生物资源，控制植物病害，解决育种难题等应用研究方面也发挥着重要的作用。然而，植物细胞培养物作为最直接的实验材料，虽然可在离体状态下生长繁殖，但若在体外长期传代，不可避免地会出现染色体倍数增加、自然突变基因的累积、表型回复突变的产生、有效基因型的退化或丧失、特殊产物的生物合成能力降低等现象。另外，稍不小心，还会造成微生物的污染，使历经千辛万苦获得的研究材料毁于一旦。不言而喻，植物细胞培养物的妥善保存，不仅具有重要的学术价值，而且还有潜在的经济效益。本节重点介绍水稻细胞培养物（愈伤组织）的冻存方法，为其他植物细胞培养物的冻存提供参考。

水稻是世界上主要的粮食作物之一，如何提高水稻产量，增强品种抗性，获得优良品种和保持优良性状一直是科学家面临的重大课题。稻属中有 22 个种，包括 6 个基因组，拥有丰富的基因库。但稻属 22 个种中，仅 2 个为栽培种，其余 20 个均为野生稻种。从生理、遗传的研究所知，野生稻是稻种资源的重要组成部分，它是天然的基因库，保存着栽培稻不具有的或已经消失了的遗传基因，并具有丰富的特殊优良农艺性及抗性。此外，野生稻不仅是水稻育种的宝贵材料和新基因的重要来源之一，而且又是研究稻种起源、演变及分化的依据。因此，对野生稻的搜集、研究、保存历来受到世界各国水稻工作者的重视。作者与武汉大学遗传研究所舒理慧教授合作，对野生稻愈伤组织的诱导、分化、冻存及冻后植株再

生进行了广泛深入的研究，探索出成功冻存野生稻愈伤组织培养物的有效方法，其操作程序如下：

一、供试材料及愈伤组织的制备

普通野生稻 (O. rufipogon AA)

长雄蕊野生稻(O. longistaminata A'A')

小粒野生稻 (O. minuta BBCC)

药用野生稻 (O. officinalis CC)

高秆野生稻 (O. alta CCDD)

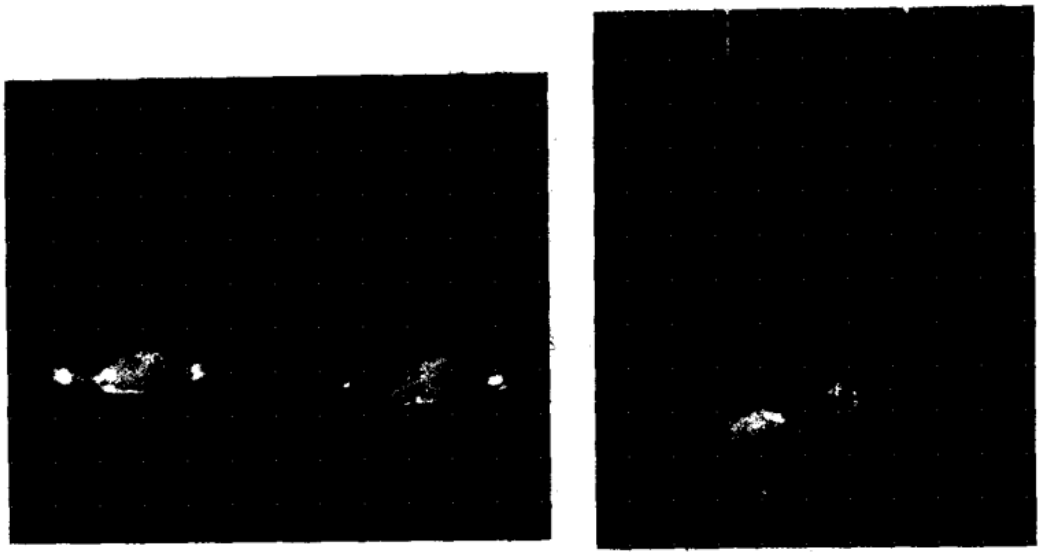
宽叶野生稻 (O. latifolia CCDD)

疣粒野生稻 (O. meyeriana)

供试野生稻大田栽培，选择合适的分蘖，流水洗净，用70%的酒精表面消毒，剥除外部数层叶片及叶鞘至最后一层叶鞘与节，在超净工作台上用0.1%升汞消毒10分钟，再用无菌水冲洗3次。小心剥出细穗，确定发育时期后，接种于固体诱导培养基上，26℃黑暗培养。接种7～10天后，幼穗显著膨大；约15～20天后，幼穗上膨大的颖花表面开始愈伤组织化，渐渐整个颖花开成一块愈伤组织。研究发现，对于固体培养的愈伤组织来说，选择10～15天龄的愈伤组织作为超低温冻存的材料较为适宜，且细胞冻后的恢复生长宜在黑暗中进行，因为光氧化作用对冻后材料是有害的。我们选择再培养14天的愈伤组织作超低温冻存材料，并在冻后进行暗培养，取得较好的冻存效果(图13-1)。

二、冻存保护剂的优化组合

选择继代培养14天、处于对数生长期的野生稻愈伤组织用于冻存研究。待冻存愈伤组织以2～3mm大小的细胞团为佳，用几种不同成分和配比的保护剂预处理，比较它们的冻存效果。从多种野生稻愈伤组织冻后检测结果看，保护剂的组成是提高冻后细胞存活率的关键，而且混合保护剂的作用效果比单独使用DMSO更好。但DMSO与甘油、蔗糖、山梨醇混合使用效果不佳，而10% DMSO与8%葡萄糖的组合取得最佳的保存效果(表13-1)。



A. 暗修复前　　B. 暗修复后　　C. 再生植株的试管苗

图 13－1　普通野生稻的冻后愈伤组织暗培养及再生植株

表 13－1　冰冻保护剂对野生稻愈伤组织冻存的作用效果

保护剂种类	冻前细胞活力（TTC 值）	冻后细胞活力（TTC 值）	冻后细胞存活率(%)
对照	1.2	0.027	2.3
10% DMSO	3.9	0.52	13.5
10%DMSO＋10%甘油	3.9	0.65	16.7
10%DMSO＋10%蔗糖	1.8	0.43	24.2
10%DMSO＋0.5M 山梨醇	1.9	0.38	20.1
10%DMSO＋8%葡萄糖	2.1	1.29	61.4
10%DMSO＋10%甘油＋8%葡萄糖	1.5	0.75	50

三、降温冻存方法的比较

如前所述，迄今采用的降温冻存方法主要有三种：快速冰冻法、慢速冰冻法及逐级冰冻法。慢速冰冻法是应用最广泛的冰冻方法，它通过缓慢降温使冻存材料的温度从 0℃ 降到 －100℃ 左右，然后投入液氮长期贮存。改良的慢速降温冰冻法则是通过缓

慢降温，使待冻存材料的温度从0℃降到一定的预冻温度，并停留适当的时间，再投入液氮贮存。这种方法是为了使细胞内的水有足够的时间不断流到细胞外结冰，从而使细胞内的水减少到最低限度，达到良好的脱水效应，避免细胞内结冰的不可逆性损伤。我们比较了两种慢速冰冻法的保存效果，发现两种方法效果比较一致，都适于野生稻愈伤组织的冻存。当待冻存材料以1℃/min的降温速率降到－40℃时，能保持较高的冻后活性，而预冻期间停留适当的时间，能显著增强冻后细胞活性(表13－2)。

表13－2　降温方法对野生稻愈伤组织冻存后存活率的影响

冰冻降温方法	冷冻前细胞活力（TTC值）	冷冻后细胞活力（TTC值）	冻后细胞存活率（%）
1. 0℃，以1℃/min降至－40℃→LN_2	3.000	1.119	37.3
2. 0℃，以1℃/min降至－40℃→保温60min→LN_2	2.200	1.340	60.9
3. 0℃，以1℃/min降至－10℃→保温15min，再以1℃/min降至－40℃→保温60min→LN_2	3.300	2.430	73.6
4. 0℃，以1℃/min降至－100℃→LN_2	1.950	1.500	76.9

四、野生稻愈伤组织对超低温冻存的反应及冻后植株再生

对7种野生稻10个编号的愈伤组织进行了超低温保存研究，冻后通过TTC法检测细胞的存活率，细胞存活率的波动范围在50.8%～87.9%之间(表13－3)。普通野生稻、宽叶野生稻、疣粒野生稻和匍匐型野生稻均获得了冻后再生植株(图13－2)。

冻后细胞存活率的差异不仅存在于不同的野生稻之间，而且在同种野生稻不同编号间也差异明显，这表明基因型的不同是植物具有不同抗冻力的内在因素。这种结果与Ulrich在栽培稻上得到的结果一致。Ulrich对6个品种栽培稻愈伤组织进行了超低温保存比较，发现它们的冻存效果各不相同。

在水稻细胞的超低温冻存中，冰冻对细胞膜有不利影响，有时

造成生理上的损伤,致使呼吸作用放慢,减缓了葡萄糖的吸收,促进了细胞内钾离子的损失,加速了脂质的过氧化反应。所幸的是,这种生理上的冰冻伤害对植物细胞来说往往是非致死性的,在冻后细胞的恢复再生长之前有一个停滞期用来修复这种损伤。故水稻细胞冻后的化学活性测定法(TTC 法),有时难以反映其内在状况,而细胞的冻后再生才是检测细胞活力的唯一可靠方法。在研

表 13-3　　野生稻愈伤组织的超低温保存效果

野生稻种	基因型	产地	冻前细胞活力(TTC 值)	冻后细胞活力(TTC 值)	冻后细胞存活率(%)
普通野生稻	AA	广西	0.580	0.433	74.7
EP_4	AA	广西	1.430	1.045	73.1
EP_5	AA	广西	1.605	1.165	72.6
EP_9	AA	广西	0.807	0.580	71.9
长雄蕊野生稻	A'A'	赞比亚	0.218	0.162	74.3
小粒野生稻	BBCC	菲律宾	1.820	1.012	55.6
药用野生稻	CC	广西	2.250	1.668	74.1
高秆野生稻	CCDD	巴西	1.950	0.990	50.8
宽叶野生稻	CCDD	墨西哥	0.700	0.615	87.9
疣粒野生稻		云南	1.300	1.035	79.6

A. 普通野生稻编号 EP5 的冻后再生植株

B. 普通野生稻匍匐型的冻后再生植株

C. 宽叶野生稻的冻后再生植株　　D. 疣粒野生稻的冻后再生植株

图 13－2　野生稻冻后再生植株

究中注意到，非胚性愈伤组织在冻后通过 TTC 法测定也表现出一定的存活率，但它却不能恢复生长，而结构紧密的愈伤组织在三种野生稻（普通野生稻、宽叶野生稻、疣粒野生稻）中都恢复生长。

由于冰冻与解冻的伤害，冻后植物细胞在生理与结构上都将不同于正常细胞。Kuriyama 等发现，铵离子对冻存后的水稻细胞有害，它阻止细胞的修复过程，但它对正常水稻细胞生长有促进作用。因此，冻后的水稻细胞适宜在无 NH_4NO_3 的培养基上生长。在野生稻愈伤组织的冻存研究中，我们采用无 NH_4NO_3 的培养基进行冻后愈伤组织的恢复生长，并将恢复生长的愈伤组织转入分化培养基中，有 3 种野生稻得到了冻后再生植株。其中普通野生稻和宽叶野生稻的冻后再生率都低于对照，而疣粒野生稻的冻后再生率为 91.7%，大大超过了冻前对照的 61.5%。

§13.2　植物分生组织、芽端的冻存

植物分生组织培养技术已被广泛应用于许多种属的增殖和可能的植物病原消除研究中，使某些异变植物的子代的遗传物质能

稳定的保持。长期、稳定地保存植物的分生组织有利于种质资源的更新、换代、交换。尤其是无性繁殖的植物种属，保存分生组织无疑是优中之优的方法。即便是在种子植物的长期保存中，分生组织、芽端的保存也有其优越性。以分生组织、芽端的形式保存，一般能有效防止环境因素的干扰，延长保存期限，提高保存质量。目前，植物分生组织、芽端的保存，一直朝着短期→中期→长期的方向努力，像土豆、草莓、碗豆、油菜等植物分生组织、芽尖常温、低温、超低温的保存已能常规进行。但很多植物种属以组织形式保存还存在很多困难，有时甚至是短期保存也不行，有待于继续探索。

就保存技术而言，植物分生组织、芽端的超低温保存较细胞培养物保存难度更大，原因在于分生组织、芽端的细胞质分布均匀且稠密，对低温冰冻极为敏感，冰冻过程中的损伤效应特别突出。同时，分生组织、芽端必须保持结构的完整性才能快速分化，那怕是局部的冰冻损伤都会影响冻后的正常分化。所以，应尽可能采取更多的手段来保证分生组织、芽端在冻存过程中免受损伤。

采用慢速降温技术冻存植物的分生组织、芽尖时，其降温速率的要求比细胞培养物的冻存更为严格。例如，碗豆分生组织冻存的降温速率为0.6℃/min，而草莓则为0.84℃/min，土豆的芽端冻存以0.5～1.0℃/min为佳，高于或低于最适降温速率均不同程度地影响冻后生存率。因此，分生组织、芽端的慢速降温需使用精密的程控降温仪或严格的降温程序。

一、芽端的程控降温冻存方法

（一）芽端的解剖

（1）选择同一发育期的顶端芽端，适当消毒处理后备用。

（2）挑取芽端，放置于无菌滤纸上吸去残余水分，置于双目解剖显微镜下观察，选择适当的芽段，用5号针头轻轻剖去初生叶片，换解剖刀将芽端切成0.3～0.5mm大小。

（3）解剖后的芽端段块移至新的滤纸桥上，于标准液体培养基中浸湿。对于某些难保存的材料，采用0.5%～5%（V/V）的

DMSO 浸湿芽块，可提高冻后存活性。

（4）将芽块滤纸桥置于标准培养基中，在适宜温度下预生长 1～3 天。

（二）芽端冻存

（1）挑取 15～20 块预培养的芽块，小心地放入含有 0.5～1.0ml 10%（*V*/*V*）DMSO 的低温冷冻管中，于室温（25℃）平衡 1 小时。

（2）将装芽端的冷冻管移至预冷至 －5.0℃ 的程控降温仪冷冻室内，使芽块预冷 10 分钟。

（3）通过机械自转动的方式或手动的液氮接触操作，诱导组织冰晶形成。

（4）将芽块于 －5.0℃ 继续冷却 10 分钟。

（5）以 －0.4℃ /min 的降温速率，使芽块温度降至 －35℃，立刻转入液氮中贮存。

（三）芽端的解冻与培养

（1）于 45℃ 水浴中快速解冻，挑取芽块到无菌滤纸片上，充分吸干以去除残存的保护剂系统。

（2）芽块解冻后，尽可能用 TTC 法检测其生存率，掌握芽块冻存过程中的动态变化。

（3）分别接种芽块到含有不同激素的三种标准培养基中，于适宜温度下培养：

① 标准培养基含 0.2mg/L 的赤霉素（gibberellic acid，GA_3）。

② 标准培养基含 0.5mg/L 的吲哚乙酸（indole acetic acid）。

③ 标准培养基含 0.5mg/L 玉米素（zeatin，mixed isomers）。

（4）待芽块开始分化后，重新接种到新鲜的标准培养基上继续培养。

二、根尖的程控降温冻存方法

根是植物重要器官，它在植物的营养吸收中起决定性的作用。植物根尖的冻存对于研究其结构、功能提供了新的材料来源，为探索根尖组织对低温的耐冻性开辟了新的途径，在理论和实际上都

有重要意义。下面通过转化毛根的冻存介绍根尖的冻存程序及基本操作。

(1) 将培养的转化毛根移到洁净的平皿中,置于双目解剖显微镜下,用解剖针轻轻剖断根尖、并切成2～4mm长短。此操作需要在液体培养基中进行,否则将增加操作的难度。

(2) 转移根尖到2ml容积的冷冻管中,缓缓加入0.5ml 10%(*V*/*V*)的DMSO(DMSO用液体培养基配制)。

(3) 将浸泡根尖的冷冻管置室温(25℃)平衡1小时。

(4) 转移冷冻管到程控降温仪的冷冻室内,以1.0℃/min的降温速率从25℃降温到－30℃。

(5) 直接投冷冻管到液氮中贮存。

(6) 将根尖于45℃水浴快速解冻,转移到双层滤纸表面,吸去残余的保护剂(DMSO),然后再将根尖接种到标准半固体培养基上培养。

(7) 同时取样进行活性检测,计算生存百分率。

(8) 接种的根尖于28℃培养,观察分化、生长情况。

三、分生组织的微滴冻存方法

微滴冻存方法以铝箔为支撑物,增加了金属导热性,使降温过程中温度均匀分配,促使冻存材料同质降温,减少了异质冰晶的形成。对于某些采用快速降温或慢速降温方法亦难于冻存的分生组织来说,微滴冻存无疑是一种很好的方法。微滴冻存方法演变于慢速降温程序,其基本操作如下:

(1) 用常规方法制备分生组织,用保护剂(15%DMSO＋3%蔗糖)预处理20～30分钟。

(2) 将铝箔纸剪成适当大小,铺平在平皿底部,高压灭菌,烘干备用。

(3) 滴加保护剂到灭菌后的铝箔纸上,每滴以2～3μl为佳,然后将预处理过的分生组织轻轻移至微滴上。

(4) 连同平皿一起将铝箔微滴移到程控降温仪的冷冻室内,以0.5℃/min的降温速率降温至－25℃、－30℃、－40℃,然后贮

存于液氮中。

(5) 室温解冻(一般 20 秒)

(6) 测定分生组织冻后的活性及再生能力。

四、芽端的包裹和脱水冻存法

(1) 解剖芽端(操作如前)。

(2) 用前述的包裹技术制备海藻酸盐包裹芽端微球,每一微球包裹 2～3 块芽端。

(3) 将芽端微球置于含 0.75mol/L 蔗糖的标准液体培养基中,振摇脱水 72 小时。

(4) 将脱水后的芽端微球移至滤纸上,吸去残余水分,用无菌空气风干脱水 4 小时。

(5) 将芽端微球移至冷冻管中,直接投入液氮保存。土豆芽端微球以程控降温程序冻存效果更佳。

(6) 芽端微球于 25℃下解冻,接种到半固体标准培养基上培养。如切开包裹微球,更有利于芽端恢复生长。

现有资料的结果证明,包裹和脱水冻存芽端的方法具有广泛的应用前景。目前,已有葡萄芽端、梨子芽端、桑树芽端、油菜芽端冻存成功的报道。稍加改良,包裹和脱水冻存法还可用于体细胞胚的冻存。

§13.3 植物花粉、胚的冻存

一、花粉的冻存

植物花粉是植物种质的一种形式,它含有本植株的各种基因型,是种质保存和交换的极好材料。但是,花粉寿命很短,离开植株后,常温下存活时间不长,玉米花粉仅存活十几小时,黑麦花粉存活不到 1 小时,这给授粉带来极大困难,使相关的植物遗传研究大为不便。超低温保存花粉的成功,使花粉的贮存、运输、交换成为可能。同时,保存的花粉还可直接为育种服务,对克服育种中常遇到的杂交亲本"花期不遇"的问题能起到雪中送炭的作用。建立

可靠的花粉冻存程序，对推广和使用冻存花粉具有很好的经济效益和社会效益。花粉冻存的基本操作如下：

（一）方法Ⅰ

（1）采集新鲜的花粉，经过适当的脱水处理（含水量低的花粉不用脱水处理）后备用。

（2）浸泡于10%的DMSO保护剂中，于4℃平衡30分钟。

（3）分装于2ml冷冻管中，继续于4℃平衡20分钟。

（4）将悬浮花粉置于程序降温仪中程控降温，通常以1.0℃/min的速率降至－10℃，保温15分钟；再以1.0℃/min的速率降至－40℃，保温60分钟，直接投入液氮保存。

（5）将液氮保存的花粉管于40℃水浴快速解冻，测定生存百分率、萌发率。

此法为笔者常用的方法，进行过包括油菜、紫菜苔在内的多种花粉的冻存研究，获得稳定的结果。冻存的花粉保存半年以上，相对生活率不低于90%，且花粉原生质体的分离率可达80%以上。尤其是难于保存的幼嫩花粉或含水量较高的花粉，用此法能有效地长期保存。

（二）方法Ⅱ

（1）采集新鲜成熟花粉，风干脱水，使其含水量在10%～15%之间。

（2）将风干后的花粉装进铝箔袋中（0.5g/袋），真空封口。

（3）将铝铂袋置于4℃预冷30分钟。

（4）直接投入液氮长期贮存。

（5）于室温解冻，检测生活率及萌发率。

二、植物胚的冻存

植物胚通常似三种形式存在，即体细胞胚（somatic embryos）、性细胞胚（sexual embryos）、合子胚（zygotic embryos）。植物胚的形成、分化、发育是一个极为复杂的过程，一直是发育生物学研究的重要课题。此外，在离体条件下成功诱导胚的形成，并有效地保存这些胚是植物人工种子制备的关键。因此，植物胚的长期冻存

问题已成为植物低温生物学的研究热点，在技术上有所突破。

（一）方法Ⅰ

（1）用常法制备体细胞胚，移至0.4mol/L蔗糖的标准培养基中振摇培养，使其预生长24小时（密度为10ml内含100个胚）。

（2）将预生长的体细胞胚离心收集（1000r/min），转移到含1.0ml冻存基质中（10%DMSO，用生长培养基配制）的低温冷冻管中。

（3）放冷冻管于低温冰箱中（-20℃以下）预冻24小时。

（4）将预冻的体细胞胚直接投入液氮贮存。

（5）取出贮存的体细胞胚管，于40℃水浴快速解冻，接种到含0.015mol/L蔗糖的标准培养基中，用常法培养。

（6）观察胚的分化状况并测定生理、生化指标，评估冻存效果。

（二）方法Ⅱ（低温保护剂脱水法冻存体细胞胚）

（1）用常法制备体细胞胚，于补加0.3mol/L蔗糖的标准培养基上培养2个月，作适应性脱水。

（2）转移体细胞胚到补加0.75mol/L蔗糖的半固体标准培养基上脱水处理7天。

（3）解剖胚组织，移至低温冷冻管中，然后直接投入液氮中贮存（对油棕榈的体细胞胚冻存尤为有效）。

（4）对于难冻存的植物体细胞胚，采用程控降温技术将显著提高冻存效果（具体操作如前所述）。

（5）将冻后的体细胞胚于45℃水浴快速解冻，接种到含0.3mol/L蔗糖的半固体标准培养基中培养2周，再于0.1mol/L蔗糖的标准培养基上常规培养，检测体细胞胚的发芽率及成苗情况。

（6）视实验室条件，选择适宜的方法测定体细胞胚的冻存效果。

此法的关键性突破是无需使用低温保护剂，脱水后的体细胞胚在固态下冻存。脱水适度的控制极为重要，否则将影响冻存

质量。

（三）方法Ⅲ（包裹和脱水结合冻存体细胞胚）

（1）用常法制备和收集体细胞胚。

（2）用海藻酸盐包裹体细胞胚（详细操作如前所述），制成体细胞胚微球。

（3）转移包裹微球到含0.3mol/L蔗糖的标准液体培养基中，作脱水处理，通常于振荡器上振摇18小时，以达到充分脱水。

（4）将脱水后的体细胞胚微球移到洁净的滤纸片上，吸去残余的水分，然后置无菌层流空气下继续风干脱水10小时。

（5）挑取干燥胚球到低温冷冻管中，直接投入液氮贮存。

（6）将胚球于室温下（25℃）解冻，转移到半固体标准培养基上培养，观察发芽及成苗情况。

（7）根据需要，检测胚球的其他指标，评估冻存效果。

（四）方法Ⅳ（空气风干脱水法冻存种子植物的合子胚轴）

（1）精选待保存的植物种子，并作适当的表面消毒处理。用无菌操作解剖种子，取出胚轴放置于洁净的容器中。

（2）将胚轴置于无菌层流空气下风干脱水3小时，脱水后的胚轴含水量以10%～15%为宜。

（3）将脱水后的胚轴转到低温冷冻管中，然后浸泡在液氮中贮存。

（4）将胚轴于37～38℃水浴中解冻。

（5）放胚轴在无菌水浸湿的滤纸片上，于适宜条件下放置10天以上。

（6）挑取胚轴接种到标准营养培养基上，让其继续分化生长。

（7）观察胚轴分化生长情况，评估冻存效果。

（五）方法Ⅴ（保护剂脱水法冻存未成熟合子胚）

（1）用常法制备未成熟合子胚。

（2）接种未成熟合子胚到半固体脱水培养基质上（标准培养基+60%的葡萄糖+15%（V/V）的甘油），使其脱水4小时。

（3）转移脱水后的未成熟合子胚到冷冻管中，直接投入液氮

贮存。

(4) 将冻存的合子胚于 40℃水浴摇动 30 秒,使其解冻。

(5) 接种到标准恢复培养基上恢复生长,观察发芽及成苗状况。

(六) 方法Ⅵ(空气风干和保护剂脱水结合冻存成熟合子胚)

(1) 用常法制备成熟合子胚。

(2) 将成熟合子胚置于洁净的培养皿内,用无菌层流空气风干脱水 4 小时。

(3) 转移风干脱水后的合子胚到保护剂脱水基质上(标准培养基+60%的葡萄糖+15%的甘油),继续脱水 15～24 小时。

(4) 挑取脱水后的合子胚于低温冷冻管中,直接投入液氮贮存。

(5) 将冻存合子胚于 40℃水浴解冻,接种到标准培养基上,观察发芽及成苗状况。

§13.4 植物离体材料的玻璃化冻存

玻璃化(vitrification)液氮冻存植物材料是 80 年代末期建立的一项新技术。其基本原理是将植物材料浸泡于高浓度的低温保护剂中,直接投入液氮冻存。在如此条件下,整个冻存系统快速降温而不形成冰晶,以玻璃态的形式存在。玻璃态的物质结构、组成成分可长期不变,因而植物材料可达到长期保存的目的。1989 年 Langis 等和 Uragami 等相继报道,证实了玻璃化冻存多种植物材料的可行性。迄今已有十多种植物的茎尖、分生组织、体细胞胚、愈伤组织等外植体被用于玻璃化冻存尝试,并取得初步进展,表 13－4 列举已冻存成功植物种属材料的资料。

一、影响玻璃化冻存的因素

多种材料的玻璃化冻存研究表明,低温保护剂的配比及添加方法、处理时间和温度、材料冻后的洗涤条件、冻存材料的生理状态、活性检测方法的选择等均影响玻璃化冻存,这些影响因素的调

节是玻璃化成败的关键。一般认为，低温保护剂处理时间和温度、

表 13－4　　植物材料的玻璃化冻存

种属名称	试冷材料	报道年限	研究者
石刁柏	培养细胞	1989	Uragami
	体细胞胚	1989	Uragami
	愈伤组织	1991	Uragami
	多生芽	1992	Kohmura
脐　橙	珠心悬浮培养物	1990～1991	Sakai
薄　荷	茎尖	1990	Towill
	悬浮细胞	1989	Langis
黑　麦	叶肉原生质体	1990	Langis
白苜蓿	顶端分生组织	1991	Yamada
苹　果	茎尖	1992	Niino
梨	茎尖	1992	Niino
甘　薯	茎尖	1992	Towill
水　稻	悬浮细胞	1994	Katsumi
土　豆	芽尖	1993	Shaoli
茄　子	芽尖	1994	Shaoli
茶　叶	顶芽	1994	Kuranuki
石　竹	芽尖	1994	Tannoury
人　参	稀根	1994	Yoshimatsu
百合花	顶芽	1994	Matsumoto
烟　草	悬浮细胞	1994	Reinhoud
油　菜	幼嫩花粉	1997	徐秉芳、郑从义等
紫菜苔	幼嫩花粉	1997	徐秉芳、郑从义等

保护剂的成分及配比、冻融条件是几个关键的外在因素，而材料的生理状态则是重要的内在因素。在研究中可根据实验室条件，玻璃化冻存的目的、选择的材料种类等确定冻存程序。

二、玻璃化冻存的保护剂系统

玻璃化冻存是一种简单、快速的冻存技术。它省去了繁琐的降温过程，冻存材料可直接投入液氮贮存。玻璃化冻存成败的关

键，不是降温速率的控制，而是保护剂系统的合理选择。一般而论，高浓度的低温保护剂组合，有利于玻璃化的形成，但也增强了对冻存材料的细胞毒性。故迄今为止，还没有采用单一保护剂玻璃化冻存生物材料获得成功的报道。玻璃化冻存液一般至少由两种以上的低温保护剂组成，构成了冻存过程中保护剂间作用叠加效应和毒性的抵消效应。在实际操作中，通过调整保护剂的组合，使其达到多种效应的最佳状态，从而降低由于高浓度保护剂带来的毒性作用，增强保护效果。例如，二甲亚砜(DMSO)与乙酰胺组合使用，较单一保护剂的毒性低，且能稳定形成玻璃化，有利于植物材料的冻存。表 13－5 从实用的角度出发，介绍近几年使用效果较好的玻璃化保护剂系统。

表 13－5　　常用的玻璃化冻存保护剂系统

编号	保　护　剂	制备基质
1	30%DMSO＋15%乙二醇＋30%甘油	0.15mol/L 蔗糖的培养基
2	35%DMSO＋15%甘露醇＋6%白蛋白	标准培养基
3	50%DMSO＋10%甘露醇＋6%白蛋白	标准培养基
4	50%乙二醇＋15%甘露醇＋6%白蛋白	标准培养基
5	40%乙二醇＋0.25mol/L 蔗糖	PBS 液
6	20%DMSO＋8%聚乙二醇＋15%乙酰胺	PBS 液
7	36%乙二醇＋39%蔗糖	标准培养基
8	15%DMSO＋15%乙二醇＋30%甘油	0.4mol/L 蔗糖液
9	10%DMSO＋30%甘油＋10%蔗糖	标准培养基

三、玻璃化冻存的初选方案

虽然玻璃化冻存方法以其简单、快速、易操作之优点被广泛应用，但事实上，生物材料的冻后存活率还并达到最佳的效果。前面介绍的 9 组玻璃化保护剂系统也还存在一定的局限性，这同玻璃化液中高浓度保护剂的存在有关。只有充分调整、优化冻存条件，才能降低高浓度保护剂产生的毒性作用。尤其是植物材料的冻存更是如此，作者设计的玻璃化冻存初选方案，选出的冻存程序，用

于多种植物材料的玻璃化冻存，获得理想的冻存效果（活性 80% 以上）。因此，选用作者提供的玻璃化冻存初选方案是可行的。

（一）实验材料的制备

（1）采集拟冻存的材料，经过适当的消毒处理，进行常规的预培养备用。若是组织、器官、胚的冻存，适当剪成小块即可。

（2）材料经过保护剂逐级处理，使其达到充分平衡。

（二）玻璃化冻存最佳低温保护剂系统的筛选

（1）采用正交实验设计，选择低毒性、高品质的低温保护剂，对其作用浓度、配比进行筛选。

（2）采用 FDA、TTC 法检测不同材料冻后的生活率，评估实验效果。

（3）通过统计学方差分析，优选出最佳低温保护剂系统组合。

（三）玻璃化冻存植物材料最佳条件的优化

采用正交实验设计，在多因素、多水平上探索影响玻璃冻存的条件：

（1）包括保护剂粘稠度、冻存温度、渗透压、pH 值的影响。

（2）冻存实验材料的生理状态、预处理时间、样品体积、复温及洗涤条件等因素的影响。

（3）通过统计学方差分析，优化冻存不同植物材料的最佳条件。

（四）玻璃化冻存效果的测定及分析

（1）用光学显微镜、扫描电镜、透射电镜观察冻后材料的细胞表面结构及亚细胞结构。

（2）利用原生质体分离法、直接培养法等测定冻后材料，直观地评估玻璃化冻存效果。

（五）最终玻璃化冻存方案的确定

（1）综合分析、比较正交实验设计方法获得的结果，找出玻璃化冻存植物材料的某些规律，优化出 2～3 组玻璃化冻存方案。

（2）根据研究的需要、批量冻存实验材料。

四、植物芽端的玻璃化冻存技术

植物芽端是植物学研究中常用的材料。它也广泛地被应用于植物材料的低温生物学研究中，并在多种植物材料芽端的冻存方面取得很大进展，建立了长期冻存的慢速降温方法。现将目前较为成熟的玻璃化冻存技术介绍如下：

（一）芽端的解剖

（1）选择同一发育期的顶部芽端，适当消毒处理后备用。

（2）挑取芽端，放置于无菌滤纸上吸去残余水分，置双目解剖显微镜下观察，取适当的芽段，用5号针头轻轻剖去初生叶片，换解剖刀将芽端切成0.3～0.5mm大小。

（3）将解剖后的芽端段块移至新的滤纸桥上，置于标准液体培养基中浸湿。

（4）连同滤纸桥一起将芽端接种到含1.2mol/L山梨醇的标准半固体培养物上预培养2～3天备用。

（二）溶液的配制

（1）玻璃化溶液(VS)的制备

① VS贮备液：甘油(*V*/*V*)30%，乙二醇(*V*/*V*)15%，DMSO(*V*/*V*)15%，标准培养液(含0.15mol/L蔗糖)100ml。

② VS平衡液(60%)：VS贮备液(*V*/*V*)60ml，标准培养液(含0.4mol/L蔗糖)40ml。

③ 洗涤液：含1.2mol/L蔗糖的标准培养液100ml。

（三）材料的预处理

（1）挑取经预培养的芽端到2ml容积的冷冻管中，加1ml VS平衡液(60%)浸泡芽端块。

（2）将芽端于25℃平衡5～20分钟。

（3）移去VS平衡液，加1ml VS贮备液(100%)，芽端应充分浸泡在VS液中。

（4）将芽端置冰浴中放置10分钟。

（四）玻璃化冻存

（1）芽端经冰浴冷浴后，直接投入液氮中贮备。

（2）记录芽端玻璃化冻存日期、数量、贮存位置等。

（五）复温

（1）将芽端冻存管从液氮取出，置于25℃水浴，使其充分解冻。

（2）芽端解冻后，立刻吸去多余的VS液。

（3）加1ml洗涤液（1.2mol/L的蔗糖液）清洗芽端，以除去残余VS液。洗涤重复3次，每次水浴30分钟。

（六）检测

（1）取少量芽端材料，用TTC法检测生存率。

（2）移取洗涤后的芽端到5cm大小的滤纸片上，以滤纸为载体，置于标准半固体培养基上培养。

（3）每日更换滤纸片，直到芽端增生为止。

（4）挑取增生的芽端，接种到新鲜的标准生长培养基上继续培养。

（5）观察芽端生长情况，推算芽端冻后生存率。

五、植物材料玻璃化冻存效果的评估

从实用的角度看，用玻璃化技术冻存植物材料是非常有用的，尤其是植物的芽端、茎尖、分生组织、体细胞胚、花粉等材料。甚至有人报道，像石刁柏多生芽簇、甘薯茎尖一类材料，只有用玻璃化法冻存才能存活。此外，用玻璃化技术冻存石刁柏体细胞胚、白苜蓿分生组织、苹果和梨的茎尖、薄荷茎尖，复苏后能直接再生植株，省去了冻存材料冻后培养的复杂过程，形成了分化、扩增、再分化和植株再生的一体化。作者采用玻璃技术研究了紫菜苔、油菜、小白菜幼嫩花粉、成熟花粉的冻存效果，通过FDA检测、花粉萌发试验，证明玻璃化冻存效果甚佳。

附　录　专利培养物保藏

培养物(culture)通常指用人工能够培养、复制的生物材料。它包括细菌、放线菌、酵母菌、真菌、原生动物、单细胞藻类、噬菌体、动植物病毒、动植物细胞系、组织、器官甚至个体,以及能在生物体内和体外进行复制,使其遗传信息得以衍生的重组 DNA 分子,如质粒、克隆载体、基因片段等。在专利文献中,各国习惯把专利培养物统称"微生物菌种"。但专利微生物菌种保藏,从保藏范围看,严格来说应叫专利培养物保藏。

专利培养物保藏涉及两个完全不同的概念,即"专利"与"保藏"。通常的培养物保藏,强调的是培养物保藏技术及管理。无论是政府支持的单位,还是大财团、大公司资助的机构,甚至是专业实验室,只要具备保藏条件,配备专门的技术人员,均可接受培养物的保藏。专利培养物的保藏是专利与保藏二者的结合,缺一不可,除强调培养物保藏技术及管理的重要性外,还突出了其法律的严肃性。也就是说,专利培养物保藏实际上要完成两项程序:①技术性保藏,即妥善保存专利培养物达 30 年之久;②法律性作用,出具具有法律效应的保存证明。普通培养物的保藏不具备法律效应,保藏对专利无意义。所以,任何一个国家的专利局都要指定专门的保藏机构保藏专利培养物,并由指定的专门保藏机构完成从保藏到向专利局呈交具有法律效应的特殊报告(培养物活性报告)。此项工作并非一般保藏机构所能承担,也是很多生物技术发明专利申请人所不了解的。本章侧重介绍培养物保藏与生物技术专利的关系,详细提供专利培养物保藏的程序及有关手续,使生物技术发明人在申请专利的同时,能按专利程序提交专利培养物保藏。

Ⅰ. 生物技术发明与专利

一、专利的基本概念

专利一词是外来词，英语叫“patent”，法语叫“brevet”。在专利制度产生的初期，“patent”一词来源于“letter patent”。经过多年的演变，人们就简称为“patent”，译成汉语为“专利”。

在专利制度产生之初，专利是指一种发明人对其公开的发明依法享有独占权的证书。从这个意义上讲，至今性质仍没有改变。因此，实行专利制度的每个国家专利局，对授权的发明创造所有者，均颁发专利证书，在法律上证明其享有的权利。这是“专利”一词的第一个意思。专利的第二个意思是指：当人们说“我去查专利”，实为去查专利文献。它包括请求书、说明书、权利要求书和附图。专利的第三个意思是当人们说“我有一项专利”，实为是有一项受到专利法保护的发明创造。专利的第四个意思是当人们说“我买了一项专利”时，实为通过技术合同，对一项受到专利法保护的发明创造，转让了专利权或许可了专利使用权。使用权可以是独占性的，也可以是非独占性的，许可方和被许可方可以通过签订合同确定其内容。而专利权则是国家对发明人依法授予的独占实施权。这是“专利”一词的核心含义，也是专利法中要解决的最重要的问题，其基本含义是指专利权人享有禁止他人不经许可而制造、使用、销售专利产品的权利，或使用其专利保护的方法。

综上所述，专利权是一种无形财产权。它与有形财产权不一样，有其固有的特征。

二、生物技术发明专利的特殊性

依照专利法的规定，对于一项技术发明能够授予专利权，首先要看这项技术是否为专利法规定的发明，也就是说要符合专利对发明作出的定义，才能被授予专利权，否则是不能予以专利保护的。就发明的概念而言，生物技术发明与专利法中规定的发明应该是一致的；但由于生物技术本身所具有的特性，因此，在具体情

况下，两者之间在一些具体的实践或判断上还存在一定的问题，如生物技术发明与其分类的问题；生物技术发明保护范围的问题；充分公开的问题；生物技术发明的专利性问题等。

（一）生物技术发明的保护范围

在建立专利制度的国家中，生物技术发明的专利保护范围都不尽相同。鉴于越来越多的生物技术发明要求获得专利权，得到专利制度的保护，这就使得很多国家专利保护范围不断扩大，专利制度进一步完善。然而，由于各个国家经济、文化、科学发展程度的差异，专利制度建立的早迟，使专利保护范围尚未一致。尤其是对生物技术发明的保护问题，一直存在争议。目前，美国、日本专利局对生物技术发明的专利保护范围较宽，诸如产品发明、方法发明、利用发明所涉及的绝大多数生物技术发明都给予专利保护，甚至包括微生物菌种本身、动植物新品种都列入保护范围。欧洲专利局则不保护动植物新品种。修改后的中国专利法及实施细则中，对生物技术发明的专利保护范围作了明确的规定，对于涉及微生物的发明专利，从方法发明到微生物菌种本身均列为专利保护范围；而动植物新品种的发明不在保护之列，但动植物产品、品种的生产方法可以授予专利。可以预料，随着我国生物技术的发展，专利制度将会不断完善，保护范围也会日趋扩大。

（二）生物技术发明的公开

请求专利保护的发明创造，要作完整、清楚的公开，达到使同一技术领域的专业人员能够实现的程度。对于生物技术专利申请的公开也不例外。但专利对微生物学方法及其产品的发明创造的保护，由于涉及生命科学，如仅公开发明创造内容，在实际上给重复该发明造成一定的困难。因此，多数国家的专利局都规定，涉及微生物或培养物的专利申请，如果其申请文件不能将其描述到使同一技术领域的专业人员能够实现的程度，或者公众不能得到微生物菌种和细胞培养物的，则视为未充分公开。涉及微生物和细胞培养物的专利申请要能达到法定的要求，即专利申请所涉及的培养物是众所周知，公众能在商业上买到，并很易为专业人员学会

和重复;专利申请所涉及的微生物菌种已交专利局指定的保藏机构保藏,在法定的期限内,提交了保藏证明,写明保藏机构名称和保藏号;在专利申请说明书中充分描述了微生物特性、形态特征、分类和得到的方法,与已知微生物相比的重要区别,建议分类命名以及其他的数据库等。该领域普通技术人员能重复。如果不属以上情况之一,又有新的分类,则可认为是未充分公开。

(三) 生物技术发明的专利性

专利法规定发明专利必须具备三要素,即新颖性、创造性和实用性。这些专利性条件对生物技术发明也是适用的,在这一点上没有任何的特殊性。但生物技术发明的确与其他领域的发明有所不同,它具有一定的特殊性。有些问题甚至是在其他技术领域未曾见过的。

(1) 生物技术发明专利的新颖性　依照专利法一般原则规定,在申请日(或优先权日)前公开了的发明创造,即丧失了新颖性。但是,像微生物或培养物,处在自然状态,当科研人员在自然界发现这些物质,在什么条件下可以视为是新颖的? 还有保藏微生物及其他生物物质,在什么条件下又视为公开呢? 各国对这些问题说法或规定不一,很难统一。

按照专利法的一般原则,所谓使发明创造丧失新颖性的公开,要使同一技术领域的普通技术人员达到实现的程度。因此,当微生物或培养物存在于自然界中,并以一种复合形式存在,普通技术人员不知其存在的,是不能视为丧失新颖性的。这种发明创造的新颖性丧失,在于该发明创造涉及的微生物或培养物的第一次分离,其在工业上的适用的说明或确认,以及向公众公开了菌种。如果只是一种微生物或培养物在自然界存在的事实,是不能使有关发明创造丧失新颖性的。

关于向专利局指定的菌种或培养物保藏中心提供了菌种保藏申请并保藏了菌种,在没有向公众提供样品时,即不能视为丧失新颖性。各国专利法或有关条例对请求获取保藏样品的时间不同,而公开的时间限制有所不同。

在具体适用新颖性条件时，其难度在于生物技术大多数建立在科学成果的基础上，科学家又总是想尽早将自己的科学成果公布于世，但其工业实用性一时不很清楚，因此，很难在公布之前申请专利，而科学成果的公布又会使发明创造丧失新颖性。这就要求有一个宽限期。宽限期虽然在有些国家已经采用，但各国仍不统一。

(2) 生物技术发明专利的创造性　生物技术领域创造性的复杂程度与其他技术领域是一样的，难以为人所掌握。如果说，在生物技术领域有关创造性的复杂程度有其特殊之处，就是处在自然状态的某种物质的非显而易见性，在产生、分离和利用中应如何处理，还有待深入研究。

(3) 生物技术发明专利的实用性　实用性是指工业实用性。但生物技术专利的实用性有其特性，一是科学研究产生了最新的发现；二是与其他技术发明不同，是新技术的先锋。这样，就实用性而言，有可能产生如下问题：首先，工业实用性或有用性就可能成为不受专利保护的发现与受专利保护的发明创造的界线；其次，工业实用性还会成为确定发明创造的标志点。换句话说，如生物技术发明专利保护仅以工业实用性审查为基准，那么很多发明创造很难获得专利权。所以生物技术发明专利的工业实用性，“工业”一词只能作广义的解释。

Ⅱ．生物技术发明专利申请与培养物的保藏

一、专利培养物保藏的申请与保藏手续

专利法中有一个基本原则，凡要申请专利保护的发明创造，其内容要向公众充分公开。通常情况下，专利申请的充分公开，主要以说明书的形式，通过书面语言的描述或图表将发明创造的内容充分公开。但是，这种公开发明创造的方式，对于涉及培养物的发明来说，如不能得到发明所涉及的微生物菌种或细胞培养物，就不能达到充分公开发明创造的目的。因为，同一技术领域的普通技术人员，仅仅依照专利说明书和附图，不能重复涉及微生物的发

明，而必须要有该发明所涉及的微生物菌种，才能达到重复发明的目的。这如同要做面包，要是没有面包酵母，将做面包的方法说得再详细，也做不出面包来的道理一样。为此，专利法规定，涉及微生物发明的专利申请，除了要提交专利说明书外，还要在申请日或优先权日之前，最迟是当日向专利局指定的培养物保藏机构，提交微生物菌种或培养物保藏，只有这样才算是符合微生物或培养物专利申请的受理条件。可见，对涉及培养物保藏的生物技术专利申请来说，培养物的保藏最为重要。否则，专利申请将功亏一篑。因此，对于涉及培养物发明的专利申请，仅向专利局提交专利说明书等文件是不够的，只有将培养物保藏在专利局指定的专门机构中才行。因为发明的公开对于专利批准来说是必要的，通常发明的公开以书面形式公告，而培养物的公开不能充分地用文字、绘图、图表表达清楚而公开，只有培养物的公开才是有用的。中国专利法规定，培养物的公开并非像专利说明书的公开那样，任何人可以索取。第三者要得到微生物本身必须履行一定手续，得到申请人或专利局的同意才能索取。这是涉及培养物的发明专利公开的一大特点。

培养物是具有生命力的有机体，在保藏过程中，不但要保证培养物的存活，还要避免其他微生物的污染。所以保藏培养物需要专门的设备和特殊的技术手段，只有专门的保藏机构才能有效地保藏各类培养物。鉴于这些专业技术要求，各国专利局都指定专门的保藏机构来保藏专利培养物。

中国专利局公告(第八号)指定“中国微生物菌种保藏管理委员会的普通微生物菌种保藏中心”(北京)、“中国典型培养物保藏中心”(武汉大学)为中国专利培养物保藏机构。公告附有两个保藏机构的培养物保藏范围、保藏规则、收费标准。中国典型培养物保藏中心收集、保藏的专利培养物范围广泛，包括细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌、动植物细胞系、杂交瘤、病毒、体内外质粒、单细胞藻株等。现将中国典型培养物保藏中心(如下简称保藏中心)的培养物保藏手续详细列出。

（一）保藏中心关于国内专利申请人请求保藏专利培养物需要履行的手续

（1）涉及培养物的生物技术发明专利申请，申请人或其代理人应首先查阅有关目录及资料，核实其发明涉及的培养物是否属公众不能得到的，如是公众不能得到的培养物，务必及时与保藏中心联系，申请培养物保藏。

（2）申请人或代理人从保藏中心索取用于专利程序的培养物保藏登记表，认真逐条填写，签名，加盖单位公章，连同培养物样品一起寄送到保藏中心。

（3）保藏中心收到培养物样品后，根据申请人提供的培养物保存条件和检测方法，对培养物进行存活性检测。如培养物存活，且符合专利培养物保藏所规定的要求，及时向专利申请人或代理人发出培养物保存活性证明（一式两份），并在三个月内向中国专利局寄送培养物检测存活性报告。

（4）申请人应按中国专利局规定，向保藏中心交纳培养物保藏费（30年）、存活检测费。

（二）保藏中心关于国外专利申请人或代理人请求专利培养物保藏手续

国外专利申请人在中国申请涉及培养物保藏的专利时，如需在保藏中心保藏有关的培养物样品，以“涉及培养物保藏的请求书”形式提出，填明有关事项，并在专利申请日之前或最迟在申请日，将培养物样品提交到保藏中心保藏。

鉴于国外培养物进入中国境内存在携带传染病源的危险性，中国专利局、卫生部、农业部共同制定了关于专利培养物进口检疫的暂行规定。规定指出，凡是从国外入境的培养物必须事先申报，经国家有关检疫部门批准，获得入境许可证后，方可入境。因此，国外专利申请人需要在保藏中心保藏专利培养物时，要委托中国涉外代理机构或保藏中心申报入境许可证。通常国外申请人至少在预定申请日的一个月前向受委托机构寄送“涉及培养物保藏的请求书”，并注明申请保藏的培养物名称、数量、来源及分类命名、

简要特征、用途、对人和动植物、环境的危害程度；申请人的姓名、国籍、地址、传真号等。受委托机构收到请求书后，着手办理专利培养物入境许可证手续。目前，中国涉外专利代理机构委托保藏中心办理培养物入境许可证手续。具体做法如下：

(1) 中国涉外专利代理机构收到国外专利申请人的“涉及培养物保藏的请求书”后，用电函将有关资料通知保藏中心，委托保藏中心办理培养物入境许可证手续。保藏中心收到电函，立刻填写申报表，向国家卫生检疫主管部门申报微生物入境许可证，从申报到主管部门批复，通常一至二周。

(2) 保藏中心收到检疫部门许可证批复后，电函通知涉外代理机构培养物入境许可证号，并由涉外代理机构通知申请人直接寄送培养物到保藏中心。如国外申请人提交保藏的培养物是中国严禁入境的，卫生检疫部门批复不予入境的，保藏中心将尽快通知申请人。

(3) 当国外专利申请人提交保藏某些特殊培养物，如动植物细胞系、病毒、体外质粒等，寄送途中务必冷藏包装，并在培养物寄送两天前，将航班号、货号、到达中国境内机场的日期等，用传真通知保藏中心。

(4) 保藏中心收到国外申请人提交的培养物后，按其提供的培养条件、存活检测方法，尽快进行存活性检测，并报告检测结果。

(5) 国外申请人向中国涉外专利代理机构提交“涉及培养物保藏请求书”时，如该培养物已由同一申请人保藏在保藏中心，则不必寄送培养物样品，只在申请文件中注明所保藏培养物的名称、保藏号、保藏日，并附上保藏中心培养物存活证明即可。

(三) 各类专利培养物提交保藏的数量

专利培养物保藏是以收集专利细胞培养物及有关材料和提供生物技术发明专利许可证贸易所需的原始种、株为目的。作为培养物种、株保存，其实用价值的最基本要求是必须保证是纯种，入库的种、株不能存在任何微生物的潜在污染和细胞培养物种间的交叉污染。作为专利培养物保藏，仅保持纯种是不够的，最重要的是要使保存培养物所具有的某些特性(生理特性、代谢产物产生能

力、单克隆抗体产生能力、外源基因表达等)能稳定存在。鉴于此目的,各国专利局对专利培养物保藏要求极为严格,专门制定实施细则,要求保藏一定数量的原始材料达 20～30 年之久。保藏中心根据中国专利局的有关规定,参考国外的保藏惯例,结合我国的国情,对各类专利培养物提交保藏的数量作出规定,见附表－1。

附表－1　　专利培养物提交保藏数量

培养物名称	培养物状态	数量(支)
细菌、放线菌、酵母菌 丝状真菌、单细胞藻株	冻干安瓿或斜面	5
动物细胞系	冷冻安瓿	12
植物组织培养物	培养状态	10
动植物病毒	冷冻或冻干安瓿	12
体外质粒、DNA 载体	冷冻状态	5
植物种子	优质种子(含水量约 5%)	2000 粒/份

(四) 专利培养物保藏的基本程序

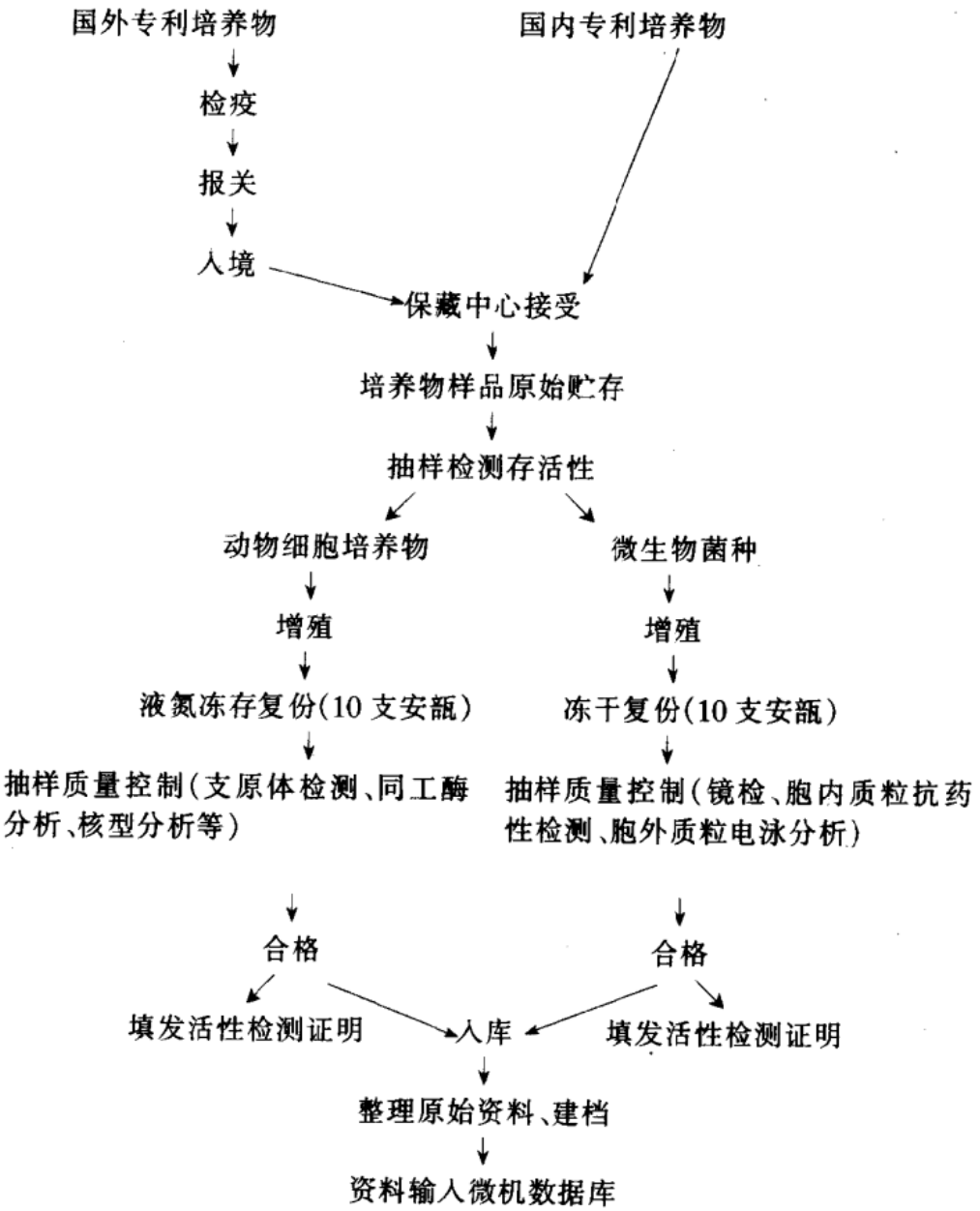
专利培养物保藏在中国尚属开拓性工作,有一个起步、探索、完善、成熟的过程。保藏中心从起步就参照国外的专利培养物保藏标准进行工作和管理。经过十几年的努力,摸索制定了一套适用的专利培养物保藏程序(附图－1),在培养物接收、培养、增殖、冻存、复苏、检测、技术档案记录等方面都规范化,使各类专利培养物能安全、有效地保藏。

(五) 专利培养物保藏表格

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的微生物(培养物)保藏登记表见附表－2。

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的培养物保藏存活性报告书见附表－3。

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的培养物保藏存活性证明书见附表－4。



附图－1　专利培养物保藏基本程序

附表－2

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的微生物(培养物)保藏登记表

中 国 典 型 培 养 物 保 藏 中 心

CHINA CENTER FOR TYPE CULTURE COLLECTION

地　址:中国.武汉.武汉大学　　邮　编:430072

电　话:(027)87682319　　传　真:(027)87883833

用于专利程序的微生物保存登记人册表

本保藏中心使用
CCTCC NO:_____
收到日期　　年　月　日

1. 培养物名称(属、种的学名):

2. 请求保藏人对培养物指定的名称、株号和符号(包括基因型):

3. 该培养物是否为混合培养物? 如是,请注明其组份以及能检查各组份存在的方法:

4. 该培养物的培养条件、检测存活性条件(培养基成分、pH、温度等):

5. 该培养物是否危及人类健康或动、植物病原或污染环境? 请详细注明:

6. 该培养物由何处何种基物分离到:

7. 建议保存该培养的最适宜方法，如用冷冻真空干燥法保存，那种保护剂更为理想：

8. 其他需说明的事项：

我(们)理解而且同意下列事项：

(1) 我(们)请求中国典型培养物保藏中心保存我(们)所提交的用于专利程序的培养物；

(2) 我(们)理解并依照中国专利局公布的“用于专利程序的微生物保藏办法”办理委托保存培养物手续、并遵照规定，执行协议；

(3) 我(们)同意提交的培养物保存期限为 30 年(自保藏中心收到之日起计算)。期满前收到提交培养物样品的请求后再延续保存 5 年，在此期间内不撤加保存物和有关的资料；

(4) 我(们)将按照规定缴纳保藏、存活性检测、提供样品等费用。

9. 请求保藏人的详细地址：(包括电话，邮政编码)

10. 请求保藏人姓名、签字和日期：

姓名_____签字或盖章_____年____月____日

11. 专利代理人的详细地址：(包括电话，邮政编码)

12. 专利代理人姓名、签字和日期：

姓名_____签字或盖章_____年____月____日

13. 中国典型培养物保藏中心负责人姓名、签字和日期：

签字或盖章_____年____月____日

注：填写时字体必须清晰：

记事：

附表－3

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的培养物保藏存活性报告书

中 国 典 型 培 养 物 保 藏 中 心

用于专利程序的培养物保藏存活性报告书

地　址:中国.武汉.武汉大学　　邮　编:430072

电　话:(027)87682319　　传　真:(027)87883833

中国专利局

Applicant:

Agent:

Appli No:

提交给保藏中心请求保藏的培养物(株):

已于　　年　　月　　日收到,经审查,检验符合规定,本保藏中心已登记入册,其编号为 CCTCC NO:

该培养物(株)的存活性于　　年　　月　　日检测,结果是存活。

特此通知

中国典型培养物保藏中心

负责人(签名)

年　　月　　日

附表－4

中国典型培养物保藏中心用于专利程序的培养物保藏存活性证明书

中 国 典 型 培 养 物 保 藏 中 心

用于专利程序的培养物保藏受理通知书(收据)

地　址:中国.武汉.武汉大学　　邮　编:430072

电　话:(027)87682319　　传　真:(027)87883833

请求保藏人和其代理人:

请求保藏人:

专利代理人:

专利申请号:

您(们)提供请求保藏的培养物名称及注明的鉴别特征:

本保藏中心保藏编号 CCTCC NO:

上述请求保藏的培养物附有

□ 科学描述

□ 提议的分类命名

注: 在框内打√号表示有,打×号表示没有。

该培养物已于_____年_____月_____日由本保藏中心收到,并登记入册。根据您(们)的请求,由该日起保存30年,在期满前收到提供培养物样品的请求后再延续保存5年。

该培养物的存活性本保藏中心于_____年_____月_____日检测完毕,结果为存活。

中 国 典 型 培 养 物 保 藏 中 心

负责人(签名)

年　　月　　日

二、国际承认用于专利程序的培养物保藏

迄今，各国专利法中都明确规定，涉及培养物的生物技术发明专利申请，除了要向专利局提交专利说明书等申请文件外，还要在申请日或优先权日前，最迟是申请日向专利局指定的保藏机构，提交专利申请涉及的培养物样品用于专利保藏，并声明对公众公开，这才算符合涉及培养物的专利申请的受理条件。显而易见，申请人想在几个国家同时申请同一内容的专利时，就得事先向几个国家分别提交培养物保藏，这就造成人为的多次重复保藏同一样品。另外，培养物是具有生命的有机体，需要一定的贮存、运输和寄送条件。加之，培养物入境检疫、海关入关的影响，各国专利局指定保藏机构保藏范围、工作程序要求不一，给申请人带来极大的麻烦，并加重经济上的负担，稍有不甚，还会出现寄送途中的丢失，损害申请人的利益。更为严重的是，如寄送中出现意外，培养物会造成污染环境，危害人类健康。为了统一程序、简化手续，节省时间，达到国际标准化，1973 年，英国首先提出签定国际承认用于专利程序的微生物保藏条约的建议，尔后，该建议得到世界知识产权组织的重视，并研究采纳了英国的建议。世界知识产权组织分别于 1974 年、1975 年、1976 年召开了三次专题会议，讨论签定保藏条件的可行性。1977 年 4 月，在匈牙利首都布达佩斯召开了外交会议，有 29 个国家、11 个国际组织和 3 个观察员身份的国家及地区专利组织参加了会议，并签定了国际承认的用于专利程序的微生物保藏条约(简称布达佩斯条约)。条约对缔约国的责任、义务及国际保藏机构的申请办法、操作程序进行了明确的规定。我国于 1995 年申请加入布达佩斯条约，现为布达佩斯条约成员国。截至 1995 年底，共有 36 个国家和地区性专利组织参加布达佩斯条约。

(一) 国际专利培养物保藏机构的资格

布达佩斯条约对国际专利培养物保藏机构的资格作出了明确规定。要求国际保藏机构必须是设在缔约国领土之内。如是一政府工业产权组织设立这样的机构，该机构也必须设在该组织的成员国领土上。此外，该机构要连续存在，拥有必要技术水平的工作

人员和设备，具有审查培养物存活性和科学保存的能力；公正客观地对待任何请求保存人，并依法向公众提供保存微生物样品，同时，在保存期间，又要对公众保密，不得随意向任何人提供有关保存微生物菌种的情报。

（二）中国典型培养物保藏中心承担的国际保藏义务

非布约缔约国加入布达佩斯条约，只需按一定的程序向世界知识产权组织递交申请，经审查合格方可加入。而要成为国际承认的专利培养物保藏机构（IDA），首先要由世界知识产权组织派专家对保藏设施、人员组成、管理水平等进行考察、论证，达到布达佩斯条约规定的要求方有资格申请；再就是由保藏机构所在国政府向世界知识产权组织申请，经批准才能成为国际承认的专利培养物保藏机构。在现有的 36 个布约国中，仅 16 个国家被批准设立 IDA。中国典型培养物保藏中心于 1994 年底通过了世界知识产权组织的专家论证，并于 1995 年 7 月 1 日起成为国际承认的专利培养物保藏机构，开始履行布达佩斯条约的义务。对于中国生物技术发明的专利申请人来说，这是一件值得庆幸的大事。须知，当你的专利申请涉及专利培养物保藏，且要申请多国专利时，只要将培养物保藏在中国典型培养物保藏中心，由中心按布达佩斯条约的程序出具存活性检测证明书即可。按布达佩斯条约规定，该存活性证明书在布约缔约国内都是有效的。

（三）国际承认的专利微生物菌种保藏机构（International Depositary Authorities，IDA）

如前所述，专利局一般不具备保藏培养物的条件及技术手段。因此，各国专利局指定用于专利程序的微生物菌种保藏单位，以承担保藏专利微生物菌种的业务。国际承认的微生物菌种保藏单位，则是根据布达佩斯条约及其实施细则的规定来确定的，并依法具有一个政府机构的法律地位。到 1995 年底，国际承认用于专利程序的微生物菌种保藏机构有 28 个，它们分设 16 个国家，见附表－5。

附表－5　国际承认的专利微生物菌种保藏机构(IDA)

名称	所在国	保藏范围	1994年底前保藏专利菌种数量
澳大利亚国家分析试验室	澳大利亚(AGAL)	微生物菌种	106
比利时微生物保藏中心	比利时(BCCM)	大部分微生物菌种	53
保加利亚菌种保藏库	保加利亚(NBIMCC)	微生物菌种	703
中国典型培养物保藏中心	中国(CCTCC)	几乎所有培养物	1054
中国普通微生物菌种保藏中心	中国(CGMCC)	普通菌种	273
捷克微生物保藏所	捷克(CCM)	普通微生物菌种	32
法国微生物保藏中心	法国(CNCM)	几乎所有的培养物	909
德国微生物保藏中心	德国(DSM)	普通微生物菌种	2498
匈牙利微生物保存中心	匈牙利(NCAIM)	工业菌种	155
日本国家生命科学和人类技术学所	日本(NIBH)	几乎所有的培养物	4938
荷兰真菌保藏所	荷兰(CBS)	真菌类	530
韩国细胞系研究联盟	韩国(KCLRF)	动植物细胞系	
韩国微生物保藏中心	韩国(KCCM)	微生物菌种	
韩国典型培养物保藏中心	韩国(KCTC)	培养物	144
前苏联微生物保藏中心	俄罗斯(VKM)	工业微生物	15
前苏联科学院微生物理化所	俄罗斯(IBFM－VKM)	所有培养物	
俄罗斯国家工业微生物保藏中心	俄罗斯(VKPM)	工业菌种	56
斯洛伐克酵母保存所	斯洛伐克(CCY)	酵母菌	
西班牙普通微生物保藏中心	西班牙(CECT)	普通微生物菌种	48
英国藻类和原生动物保藏中心	英国(CCAP)	藻类、原生动物	3
欧洲动物细胞保藏中心	英国(ECACC)	动物细胞系等	753
国际真菌学研究所	英国(IMI)	真菌、细菌等	111
英国国家食品细菌保藏中心	英国(NCFB)	工业细菌类	
英国国家典型培养物保藏中心	英国(NCTC)	普通微生物	73
英国国家酵母菌保藏中心	英国(NCYC)	酵母菌类	37
英国国家工业和海洋细菌保藏中心	英国(NCIMB)	工业及海洋细菌	969
美国北方农业研究所培养物保藏中心	美国(NRRL)	以微生物菌种为主	2280
美国典型培养物保藏中心	美国(ATCC)	几乎所有的培养物	10299

主要参考文献

1. 王红，等．低温胁迫水稻幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化．植物学报，1994，28：375～380。
2. 王振山，等．生物技术与核心种质的评价和保存．作物品种资源，1994（增刊）：14～17
3. 马缘生，等．作物种质资源保存技术．北京：学术书刊出版社，1989．206～230
4. 中华人民共和国专利局公告（第八号）．1985
5. 中国多样性保护行动计划．北京：中国环境科学出版社，1994
6. 卢新雄．第一届全国种子保存会议论文集．北京：中国农业科技出版社，1994．109～115
7. 田永中，等．光敏感核不育水稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成．武汉大学学报（自然科学版），1994（4）：89～94
8. 华泽钊，等．低温生物医学中快速冷却非晶态固化问题的研究．见：陈槐卿，王存诚主编．生物医学中的热物理探索．北京：科学出版社，1994．96～104
9. 华钊泽，等．低温生物医学技术．北京：科学出版社，1994
10. 刘金刚，等．低温医学．北京：人民卫生出版社，1993
11. 孙雨珍．种子发芽力、生活力检测，种质资源低温保存原理和技术．北京：中国农业科技出版社，1995．125～162
12. 严庆丰，等．植物组织和细胞的玻璃化冻存研究．细胞生物学杂志，1994，16：117～122
13. 何洁，等．低温对水稻剑叶光合作用的影响．植物学报，1987，29：620～628
14. 宋大祥．动物多样性．生物学通报，1993（1）
15. 李全顺，等．唐菖蒲愈伤组织超低温保存．植物生理学通讯，1989（2）：48～50
16. 汤圣祥．种子超干燥贮藏，种质资源低温保存原理和技术．北京：中国农业科技出版社，1995．135～139
17. 邬申义，等．大型低温生物显微镜系统的研制．仪器仪表学报，1988（9）：90～93

18. 周明德．核心收集品的研究及其发展. 作物品种资源, 1994(增刊):3～6
19. 杨学时．家畜繁殖与人工授精学术会议论文选编．北京:农业出版社, 1980.25～35
20. 杨福愉, 等. 低温对抗冷与不抗冷水稻线粒体膜的影响. 植物学报, 1986, 28:375～380
21. 杨福愉, 等. 抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较. 植物学报, 1986, 28:607～614
22. 张贤珍, 等．国家作物种质资源数据库系统. 作物品种资源, 1991(2)
23. 陈儿同, 等．低温生物降温控温装置(专利号:91215370.9). 见:实用新型专利公报. 北京:中华人民共和国专利局, 1992(8):201
24. 陈叔平．世界作物种质资源贮存研究进展与展望. 农牧情报研究, 1989(1):29～35
25. 陈贞．国家种质库的管理, 种质资源低温保存原理和技术. 北京:中国农业科技出版社, 1995.99～111
26. 郑向黎．冻存细胞染色体的最佳复温温度研究. 第二届全国低温生物学大会论文汇编, 1997.218
27. 郑从义, 等．极端嗜盐菌冻干保藏及其质粒稳定性的研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1995, 41:60
28. 郑从义, 等. 极端嗜盐菌冷冻干燥保藏研究. 微生物学通报, 1994, 21:247～250
29. 郑从义, 等. 嗜盐细菌冷冻干燥保护剂的正交法优化. 武汉大学学报(自然科学版), 1994(1):110～114
30. 娄希祉, 等．作物种质资源, 农学基础科学发展战略. 北京:中国农业科技出版社, 1993.1～20
31. 胡佐超, 等．怎样向外国申请专利. 北京:科学出版社, 1988
32. 赵君侃．种质库设计与节能问题, 种质资源低温保存原理和技术. 北京:中国农业科技出版社, 1995.175～176
33. 梁立, 等．油菜花粉超低温保存及花粉原生质体分离．武汉大学学报(自然科学版), 1993(6):133～136
34. 梁立, 等．紫菜苔花粉超低温保存及其原生质体分离. 植物学报, 1993(35):733～738
35. 唐定台, 等．水稻原生质体产生细胞团的冰冻和冻后再生植株形成. 植物学报, 1988, 30:357～361

36. 殷晓辉，等．野生稻愈伤组织的超低温保存和冻后再生植株的形成．武汉植物学研究，1996，14：247～252
37. 徐成海，等．真空低温技术与设备．北京：冶金工业出版社，1995
38. 根井外喜男．微生物保存法．上海：上海科技出版社，1982
39. 崔聪淑．低温保存原理，种质资源低温保原理和技术．北京：中国农业科技出版社，1995．39～63
40. 章崧英，等．实用低温医学．北京：科学出版社，1994
41. 简令成．植物的寒害及抗寒性．哈尔滨：黑龙江科学技术出版社，1986
42. 简令成，等．微管的冷稳定性与植物抗寒性关系的研究．植物学报，1989，31：737～741
43. 简令成．生物膜与植物寒害和抗寒性的关系．植物学通报，1983(1)：17～23
44. 简令成．植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究．植物生理生化进展，1987(5)：1～16
45. 简令成，等．甘蔗愈伤组织超低温保存中一些因素的研究．植物学报，1987，291：123～131
46. CIP．国际马铃薯中心甘薯基因库的建立．CIP 通讯，16(2)
47. Alexander, A.D. et al. Preservation of leptospiras by liquid nitrogen refrigeration. Int. J. Syst. Bacteriol, 1972, 22: 165～169
48. Anthony, P. et al. pluronic F－68 increases the post－thaw growth of cryopreserved plant cells. Cryobiology, 1996, 33: 508～514
49. Araki, T. Changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature. Can. J. Microbiol, 1991, 37: 840～847
50. Ashwood－Smith, M. J. et al. Mutation induction in bacteria by freeze－drying. Cryobiology, 1976, 13: 206～213
51. Ashwood－Smith, M. J. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology" (M. J. Ashwood－Smith and J. Farrant, eds.). University Park Press, Baltimore, 1980, 19～44
52. Baattz, G. et al. A microprocesser－controlled rate controller for use in cryopreservation. Cryobiology, 1979, 16: 197～505
53. Bajaj, Y. P. S. Regeneration of plants from cell suspensions frozen at －20,

－70, and －196℃. Physiol. Plant, 1976,37:263～268

54. Bajaj, Y. P. S. Cryopreservation of embryos. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs" (K. K. Kartha, ed.). CRC Press, Inc, Boca Raton, FL (USA),1989

55. Baltimore, D. RNA－dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature, 1970,226:1209～1211.

56. Barbaree, J. M. et al. Cross－contamination during lyophilization. Cryobiology, 1982,19:443～447

57. Barbaree, J. M. et al. Problems in freeze～drying: Ⅱ. Cross－contamination during lyophilization. Dev. Ind. Microbiol, 1985,26:407～409

58. Barile, M. F. Mycoplasma contamination of cell cultures: A status report. In "Cell Culture and its Application" (R. T. Acton and J. D. Lynn, eds.). Academic Press, New York, 1977.291～334

59. Barile, M. F. et al. Isolation of *Mycoplasma arginini from commercial bovine sera and its implications in contaminated cell cultures*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 1971,138:432～437.

60. *Baross, J. A. et al. Microbial life at low temperature. In "Microbial life in extreme environments" (D. J. Kvshner, ed.). Academ. Press,* 1978. 9～57

61. *Benson, E. E. et al. Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. Plant Cell Tiss. Organ Cult, 1991,24:163～175

62. Benson, E. E. et al. The detection of lipid peroxidation in cryoprotected and frozen rice cells: consquences for post－thaw survival. Plant Sci, 1992, 85:107～114

63. Berg, G. R. et al. Stress proteins and thermotolerance in psychrotrophic yeasts from arctic environments. Can. J. Microbiol, 1993,33:383～389

64. Berge, T. O. et al. Preservation of enteroviruses by freeze－drying. Appl. Microbiol, 1971,22:850～853

65. Binder, W. D. et al. Freeze－preservation of suspension cultured cells of a hardwood, poplar. Cryobiology, 1980,17:624～625

66. Binder, W. D. et al. Freeze－preservation of suspension cultured cells of a gymnosperm Douglas fir. Cryobiology, 1980,17:626～627

67. Breese, M. D. et al. Storage of *E. coli* strains containing plasmid DNA in liquid nitrogen. J. Appl. Bacteriol, 1980, 48: 63～68

68. Butterfield, W. et al. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. Can. J. Microbiol, 1974, 20: 1665～1673

69. Campos, L. et al. Expression of immunological marker on leakemic cells before and after cryopreservation and thawing. Cryobiology, 1988, 25: 18～22

70. Caputo, J. Biosafety procedures in cell culture. J. Tissue Cult. Methods, 1988, 11: 223～228

71. Cella, R. et al. Freeze－preservation of rice cells: A physiological study of freeze－thawed cells. Physiol. Plant, 1982, 55: 279～284

72. Chen, E. T. et al. A new cooler with very low consumption of liquid nitrogen, Cryobiology, 1988, 25: 549～550

73. Chen, T. H. H. et al. Freezing characteristics of cultured *catharanthus roseus* (L.) G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. Plant Physiol, 1984, 75: 720～725

74. Chen, T. R. et al. Karyotype consistency in human colorectal carcinoma cell lines established *in vitro*. Cancer Genet. Cytogenet, 1982, 6: 93～117

75. Chen, T. R. *In situ* demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. Exp. Cell Res, 1977, 104: 255～262

76. Chen, T. R. et al. Cell identity resolved. Nature, 1989, 304: 106～108

77. Christensen, P. J. A microbiological study of some lake water and sediments from the Mackenzie Valley with special reference to cytophagas. Arctic, 1974, 27: 390～311

78. Cloutier J. et al. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains rhizobia. Appl. Environ. Microbiol, 1992, 58: 2846～2853

79. Cour, I. et al. Tests for bacterial and fungal contaminants in cell cultures as applied at the ATCC. TCA Manual, 1979, 5: 1157～1160.

80. Crowe, J. H. et al. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science, 1984, 223: 701～703

81. Crow, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and protein by sugars. Biochem. J, 1987, 242: 1～10

82. Curry, M. R. et al. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. Cryobiology, 1994, 31: 39～46

83. Davies, P. L. et al. In "Transgenic Models in Medicine and Agriculture" (R. Church, ed.). Alan R. Liss, New York, 1990. 141～161

84. De Antoni, G. L. et al. Trehalose a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. Cryobiology, 1989, 26: 149～153.

85. Devries, A. L. et al. Structure of a peptide antifreeze and mechanism of absorption to ice. Biochem. Biophys. Acta, 1977, 495: 388～392

86. Diamond, L. S. Freeze－preservation of protozoa. Cryobiology, 1964, 1: 95～102

87. Dilworth, S. et al. Procedures in use at the ATCC for detection of protozoan contaminants in cultured cells. TCA Manual, 1979, 5: 1107～1110

88. Dumet, D. et al. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step, Plant Cell Rep, 1993, 12: 352～357

89. Erdahl, D. A. et al. Preservation of gametes of freshwater fish. 9th Int. Congr, Anim. Reprod. and A. I. (Madrid), 1980, 2: 317～326

90. Fahy, G. M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. Cryobiology, 1986, 23: 1～13

91. Feller, G. et al. Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolable α－amylase from the antarctic psychrotrophic *Alteromonas haloplanctis* A23. J. Biol. Chem, 1992, 267: 5217～5221

92. Feller, G. et al. The β－lactamase secreted by the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A8. Appl. Envir. Microb, 1995, 61: 102～110

93. Finkle, B. J. et al. Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. Plant Physiol, 1979, 63: 598～604

94. Gao, D. Y. et al. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. Cryobiology, 1992, 29: 657～667

95. Gartler, S. M. Apparent Hela cell contamination of human heteroploid cell lines. Nature, 1968, 217: 750～751

96. Gilbert, D. A. et al. Application of DNA fingerprints for cell line individualization. Am. J. Hum. Genet, 1990, 47: 499～514

97. Goldner, E. M. et al. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Ehrh. cell cul-

tures: preculture and freeze tolerance Plant. Cell Tiss. Organ. Cult, 1991, 24:19～24

98. Gounot, A. M. Bacterial life at low temperature. J. Appl. Bacteriol, 1991, 71:386～397

99. Grout, B. W. W. et al. Structural observations on the growth of potato shoot－tip cultures after thawing from liquid nitrogen. Ann. Bot, 1980, 46:243～248

100. Grout, B. W. W. et al. Freeze－preservation of potato shoot－tip cultures. Ann. Bot, 1978, 42:1227～1229

101. Halton, D. M. et al. Cell culture quality control by rapid isoenzymatic characterization. In Vitro, 1983, 19:16～24

102. Han, R. H. et al. Experimental investigation of cooling rates of small samples during quenching into subcooled LN2. Cryo－Letters, 1995, 16:157～162

103. Haskins, R. H. et al. Freeze－preservation of pea meristemsi cell survival. Can. J. Bot, 1980, 58:833～840

104. Hauptmann, R. H. et al. Cryostorage of cloned amino acid analogresistant carrot and tobacco suspension cultures. Plant Physiol, 1982, 70:30～34

105. Hay, R. J. Preservation of cell culture stocks in liquid nitrogen. TCA Manual, 1978, 4:787～790

106. Hay, R. J. et al. Testing for the presence of viruses in cultured cell lines. TCA Manual, 1979, 5:1127～1130

107. Hay, R. J. Problems of specificity from the cell banking perspective: Colon cell lines at the American Type Culture Collection. Prog. Cancer Res. Ther, 1984, 29:3～21

108. Hay, R. J. et al. ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7th edition. Rockville, MD: ATCC, 1992

109. Hay, R. J. Cell line banks and their role in cancer research. J. Cellular Biochem. Supplement, 1996, 24:107～130

110. Hebraud M. et al. Effect growth temperatures on the protein levels in a psychrotroph bacterium, *Pseudomonas fragi*. J Bacteriol, 1994, 176: 4017～4024

111. Hew, C. L. et al. Multiple genes provide the basis of antifreeze protein di-

versity and dosage in the ocean pout. Macrozoarces Americanus, J. Biol. Chem, 1988, 263: 12049～12055

112. Hoham, R. W. Optimum temperature and temperature ranges for growth of snow algae. Arctic Alpine Res, 1975, 7: 13～24

113. Iritani, A. Problems of freezing spermatozoa of different species. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I. (Madrid), 1980, 1: 115～132

114. Isaksen, M. F. et al. Adaption of psychrophilic and psychrotrophic sulfate－reducing bacteria to permanently cold marine environmants. Appl. Envir. Microb, 1996, 62: 51～55

115. Jondet, R. Adaptation of the vertical freezing method using liquid nitrogen vapour to the 0.02ml straws. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I, 1972, 2: 1348～1352

116. Kaneko, Y. et al. Maintenance of recombiant plasmids in *S. cerevisiae* after L－drying. IFO Res. Comm, 1985, 12: 78～82

117. Kartha, K. K. et al. Cryopreservation of periwinkle *Catharanthus roseus* cells cultured *in vitro*. Plant Cell Repts, 1982, 1: 135～138

118. Katano, M. et al. A survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen. Hortscience, 1983, 18: 707～708

119. Kniazeff, A. J. et al. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. In Vitro, 1975, 11: 400～403

120. Knight, C. A. et al. (1995) Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice. Cryobiology, 1995, 32: 23～34

121. Kono, T. et al. Development of vitrified mouse oocytes ofter in vitro fertilization. Cryobiology, 1991, 28: 50～54

122. Kruuv, J. et al. Protective effect of L－glutamine against freeze－thaw damage in mammalian cells. Cryobiology, 1988, 25: 121～130

123. Leibo, S. P. et al. Microscopic observation of intracellular ice formation in mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology, 1978, 15: 257～271

124. Lubiniecki, A. S. et al. Cell bank characterization for recombinant DNA mammalian cell lines. Dev. Biol. Stand, 1985, 60: 141～146

125. Lusena, C. V. Ice propagation in glycerol solutions at temperatures below －40℃. Ann. N. Y. Acad. Sci, 1960, 85: 541～548

126. Luyet, B. J. The vitrification of organic colloids and of protoplasms. Biody-

namica, 1937, 1: 1～14.

127. Luyet, B. J. Human encounters with cold, from early primitive reactions to modern experimental modes of approach. Cryobiology, 1964, 1: 4～10

128. MacCallum K. L. et al. Thermotolerance, cell filamentation and induced protein synthesis in psychrophilic and psychrotrophic bacteria. Arch. Microbiol, 1990, 153: 585～590

129. Macy, M. L. Tests for mycoplasmal contamination of cultured cells as applied at the ATCC. TCA. Manual, 1980, 5: 1151～1155.

130. Mazur. P. The freezing of the biological system, Science, 1970, 168: 939～949.

132. Mazur, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology, 1977, 14: 251～272

133. McCoy, J. W. Microbiology of Cooling Water. Chemical Publishing Co., New York, 1980

134. Michel, V. et al. Effect of different temperature upshifts on protein synthesis by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi*. Curr. Microbiol, 1996, 33: 16～25.

135. Mills, C. K. et al. Cryopreservation studies of *Campylobacter*. Cryobiology, 1988, 25: 148～152.

136. Mitic, S. et al. Predicting the stabilities of freeze－dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. Cryobiology, 1974, 11: 116～120

137. Musso, T. et al. IL～2 induces IL－6 production in human monocytes. J. Immunol, 1992, 148: 795～800

138. Nag, K. K. et al. Freeze－preservation of cultured plant cells. I. The pretreatment phase. Physiol. Plant, 1975, 34: 254～260

139. Nag, K. K. et al. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature, 1973, 245: 270～272

140. Nelson－Rees, W. A. et al. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. Science, 1974, 184: 1093～1096

141. Nelson－Rees, W. A. The identification and monitoring of cell line specificity. Prog. Clin. Biol. Res, 1978, 26: 25～79

142. Nierman, W. C. et al. Cryopreservation of cultures that contain plasmids.

Dev. Ind. Microbiol, 1985, 26: 423～434

143. Nierman, W.C. et al. Preservation and stability of bacteriophagelambda libraries by freezing in liquid nitrogen. Biotechniques, 1987, 5: 724～727

144. O'Brien, S.J. et al. Enzyme polymorphisms as genetic signatures in human cell cultures. Science, 1977, 195: 1345～1348

145. Patterson, J. L. et al. Purification and composition of protein antifreezes with high cysteine contents from larvae of beetle, Tenebrio Molitor, J. EXP. Zool., 1982, 219: 381～384

146. Pegg, D. E. Simple equations for obtaining melting points and eutectic temperatures for the ternary system glycerol sodium chloride/water, cryo－Letters, 1983, 4: 259～268

147. Pegg, D. E. Simple equations for obtaining melting points and eutectic temperatures for the ternary system dimethyl sulphoxide/sodium chloride/water, Cryo－letters, 1986, 5: 387～394

148. Plucknett D. et al. Genebanks and the World's Food. Princeton University Press, 1987

149. Polge, C. et al. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 1949, 164: 666～668

150. Potier P. et al. Temperature－dependent changes in proteolytic activities and protein composition in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globifomis* $S_1$55. J. Gen. Microbiol, 1990, 136: 283～291

151. Potts, B.J. et al. Peroxidase－labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. J. Virol. Methods 1989, 26: 119～124

152. Ray, B. et al. Repair of injury in freeze－dried *Salmonella anatum*. Appl. Microbiol, 1971, 22: 401～497

153. Ren, H, S. et al. Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions. Cryobiology, 1994, 31: 47～56

154. Roberts M. et al. The synthesis of cold－shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophilic bacterium *Aquaspirillum arcticum*. Curr. Microbiol, 1992, 25: 275～278

155. Rochow, W.F. et al. Storage of preparations of barley yellow dwarf virus. Phytopathology, 1976, 66: 534～536

156. Rudge R.H. Maintenance of microorganisms (Kirsop B.E., ed.). London Academic Press, 1984

157. Rutzky, L.P. et al. Various isozyme gene expression patterns among human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda), 1982, 68: 81～90

158. Sasaki, M. et al. Quantitation of human mammary epithelial antigens in cells cultured from normal and cancerous breast tissues. In Vitro, 1981, 17: 150～158

159. Seibert, M. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to －196℃. Science, 1976, 191: 1178～1179

160. Shier, W.T. Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze－thaw cycle. Cryobiology, 1988, 25: 110～120

161. Sidyakina, T.M. et al. Viability and genetic stability of the bacterium *E. coli* HB 101 with the recombinant plasmids during preservation by various methods. Cryobiology, 1991, 28: 251～254

162. Simione, F.P. et al. The use of plastic ampoules for freeze preservation of microorganisms. Cryobiology, 1977, 14: 500～502

163. Sinskey, T.J. et al. Characterization of injury incurred by *E. coli* upon freeze－drying. J. Bacteriology, 1970, 101: 429～437

164. Songsasen, N. et al. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos, Cryobiology, 1995, 32: 78～91

165. Stanwood, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs" (K.K. Kartha, ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, FL. (USA), 1985

166. Steward, D.L. Observations on the fertility of frozen semen storage at －79℃ and －196℃. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. (Tranto), 1964, 6: 617～623

167. Stoeckeninus, W. et al. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell Biol, 1968, 38: 337～357

168. Sun, N.C. et al. Staining method for the banding patterns of human mitotic chromosomes. Mamm. Chromosome Newslett., January, 1973, 26～28

169. Takahashi, T. et al. Cryopreservation of purified human monocytes. Cryobiology, 1982, 19: 676～680

170. Tisserat, B. et al. Cryogenic preservation and regeneration of data palm tissue. Hortscience, 1981, 16: 47～48

171. Towill, L. E. Survival at low temperatures of shoot－tips from cultivars of *Solanum tuberosum* group tuberosum. Cryo－Lett, 1981, 2: 373～382

172. Towill, L. B. Improved survival after cryogenic exposure of shoot－tips derived from *in vitro* plantlet cultures of potato. Cryobiology, 1982, 20: 567～573

173. Towill, L. E. Low temperature and freeze－/vacuum－drying preservation of pollen. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs" (K. K. Kartha, ed.). CRC Press Inc., Boca Raton FL. (USA), 1985

174. Ulrich, J. M. et al. (1979) Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. Cryobiology, 1979, 16: 550～556

175. Uragami, A. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officialis*, Plant Cell Rep, 1991, 9: 328～335

176. Uragami, A. et al. Cryoprotection of microspore embryos of oilseed rape (Brassica napus L.) by dehydration in air with or without alginate encapsulation. Cryo－Lett, 1993, 14: 83～90

177. Van Wagtendonk－De A. M. et al. Comparision of the efficiency of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. Cryobiology, 1995, 32: 157～167

178. Vingerhoets, J. et al. A convenient and economical freezing procedure for mononuclear cells. Cryobiology, 1995, 32: 105～108

179. Ward, A. C. W. et al. Flow－cytometric assessments of ploid stability in cryopreserved dihaploid *Solanum tuberosum* and wild *Solanum* species. Cryo－Lett, 1993, 14: 145～152

180. Weiner, R. S. et al. Functional integrity of cryopreserved human monocytes. J. Natl. Cancer Inst, 1981, 66: 255～260

181. Withers, L. A. et al. Proline－A novel cryoprotectant for the freeze－preservation of *Zed mays*. Plant Physiol, 1979, 64: 675～687

182. Withers, L. A. et al. A simple freezing unit and routine cryopreservation

method for plant cell cultures. Cryo－Lett,1980, 1:213～220

183. Withers, L.A. Preservation of germplasm. Int. Rev. Cytol. Suppl, 1980, Ⅱ. B:101～136

184. Wu , D. W. et al. Purification and characterization of antifreeze protein from larvae of the beetle, Dandroides Canadensis, J. Comp. Physiol. B, 1991,161:271～278

185. Xu , B. F. et al. Cryopreservation of pollen by vitrification in *Brassica*. Wuhan Univ. J of Natural Sci,1997,2:120～123

186. Yang, D. S. C. et al. Crystal Structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications, Nature 1988,333:232～237

187. Zhang, T. T. et al. Studies on chilling sensitivity of Zebrafish embryos, Cryobiology,1995,32:239～246

188. Zhang, X. et al. National database of crop germplasm resources and its management. System in China CODATA Bulletin 1991,23:121～125

189. Zheng, C. Y. et al. Study on the preservation of freeze－drying in halophilic bacteria. Cryobiology,1994,31:603

190. Zheng, C. Y. et al. Effects of different cryopreservation systems on the viability of callus cryopreservation of HPGMR. In "Recent Advances in Cryobiology and Cryomedicine." International Academic publishers, Beijing, 1993. 176～181